

**Analyse von genetischen Läsionen
in B - Zell - Non - Hodgkin - Lymphomen und im
klassischen Hodgkin - Lymphom.**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geografie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Claudia Philipp
aus Bottrop

September 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers
2. Gutachter: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Die Entwicklung der B-Zellen	11
1.2 Pathogenese maligner Lymphome	15
1.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	19
1.3.1 Das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom	19
1.3.2 Das Follikuläre Lymphom	21
1.3.3 Die B-Zell-chronische lymphozytische Leukämie	22
1.3.4 Das Mantelzell-Lymphom	22
1.3.5 Das Burkitt Lymphom	23
1.4 Das Hodgkin-Lymphom	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit	26
2. Material und Methoden	28
2.1 DNA-Arbeitstechniken	28
2.1.1 DNA-Präparation	28
2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.1.3 Langstrecken-Inverse-(LDI)-PCR zur Analyse von IgH- und c-Myc-assoziierten Translokationen	28
2.1.4 Long Distance-(LD)-PCR	32
2.1.5 PCR zur Durchführung der Mutationsanalyse von TNFAIP3 und TRAF3	33
2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	35

2.1.7 Elution von DNA aus Agrosegelelen	35
2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten	35
2.1.9 Sequenzreaktion und Auswertung	36
2.1.10 Restriktionsspaltung	37
2.2 RNA-Arbeitstechniken	37
2.2.1 RNA-Konzentrationsbestimmung	37
2.2.2 Reverse Transkription	37
2.2.3 5'-RACE	38
2.3 Herstellung von Gewebeschnitten	38
2.4 Immunfärbung von Gewebeschnitten	38
2.5 Mikrodissektion mittels Laser Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapulting (LPC)	39
2.6 Arbeiten mit Zellen	40
2.6.1 Zellkultur	40
2.6.2 Kultivierung von Zellen	40
2.6.3 Zellzahlbestimmung	40
2.7 Verwendete Oligonukleotide	41
3. Ergebnisse	46
3.1 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens TNFAIP3 (A20) in CLL	46
3.2 Mutationsanalyse von TRAF3 im klassischen Hodgkin Lymphom	50
3.3 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner des MYC-Proto-Onkogens in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL)	54
3.4 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner der Immunglobulin-Schwerketten (IgH)-Region in B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen (B-NHL)	58
3.4.1 Translokationen t(3;14)(q27;q31) in Fall 4 (MPI-Nummer 63) und Fall 23 (MPI-Nummer 339) betreffen Chromosom 3q27	60
3.4.2 Deletion in Chromosom 14q21 – 14q32 in Fall 9 (MPI-Nummer 106)	61

3.4.3 Translokation t(7;14)(q31;q32) in Fall 10 (MPI-Nummer 108)	61
3.4.4 Translokation t(1;14)(p13;q32) im Fall 17 (MPI-Nummer 164)	64
3.4.5 Translokation t(14;19)(q32;q13) in Fall 19 (MPI-Nummer 186)	66
3.4.6 Translokation t(6;15)(p25;q32) in Fall 20 (MPI-Nummer 233)	70
4. Diskussion	72
4.1 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens TNFAIP3 (A20) in CLL	72
4.2 Mutationsanalyse von TRAF3 im klassischen Hodgkin Lymphom	73
4.3 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner des MYC-Proto-Onkogens in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL)	75
4.4 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner der Immunglobulin-Schwerketten (IgH)- Region in B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen (B-NHL)	77
4.4.1 Translokation t(7;14)(q31;q32) in Fall 10 (MPI-Nummer 108)	77
4.4.2 Translokation t(1;14)(p13;q32) im Fall 17 (MPI-Nummer 164)	79
4.4.3 Translokation t(14;19)(q32;q13) in Fall 19 (MPI-Nummer 186)	80
4.4.4 Translokation t(6;15)(p25;q32) in Fall 20 (MPI-Nummer 233)	81
4.5 Bewertung und Ausblick	82

5. Zusammenfassung	84
6. Literatur	85
Teilpublikation	98
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis:

ABC-DLBCL	<i>in vitro</i> -aktiviertes B-Zell-ähnliches DLBCL
AID	aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase
ASH	Aberrante somatische Hypermutation
BCR	B-Zellrezeptor (engl. <u>B</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor)
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
C	konstante Region der Ig-Loci (engl. Ig <u>c</u> onstant region)
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CLL	chronische lymphozytische Leukämie
CSR	Klassenwechselrekombination
D	Diversitäts-Genelement des Ig-Locus (engl. <u>d</u> iversity region)
DLBCL	Diffus-großzelliges-B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
FL	Follikuläres Lymphom
GC	Keimzentrum (engl. <u>g</u> erminal <u>c</u> enter)
GC-DLBCL	Keimzentrums-ähnliches DLBCL
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
Ig	Immunglobulin
IgH	Ig schwere Kette (engl. <u>h</u> eavy <u>c</u> hain)
Ig κ	Ig-Kappa
Ig λ	Ig-Lambda
J	Verbindungs-Genelement des Ig-Locus (engl. <u>j</u> oining region)
kb	Kilo Basenpaare
LD-PCR	Langstrecken-PCR (engl. <u>L</u> ong- <u>D</u> istance PCR)
LDI-PCR	Langstrecken-Inverse-PCR (engl. <u>L</u> ong- <u>D</u> istance- <u>I</u> nverse PCR)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex)
mRNA	Boten-RNA (engl. <u>m</u> essenger RNA)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	Nodulär Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <u>P</u> olymerase- <u>C</u> hain- <u>R</u> eaction)
RSS	Rekombinations-Signal-Sequenz
RT	Reverse Transkription
SHM	somatische Hypermutation
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. <u>T</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor)
V	Variables-Genelement des Ig-Locus (engl. <u>v</u> ariable region)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema des NF- κ B-Signalweges	18
Abbildung 2: Prinzip der Langstrecken-Inversen-(LDI)-PCR.	30
Abbildung 3: Schematische Darstellung der untersuchten Regionen der IgH-JH und IgH-Switch μ -LDI-PCR.	31
Abbildung 4: Schematische Darstellung der untersuchten Bereiche der IgH-Switch α und IgH-Switch γ -LDI-PCR.	32
Abbildung 5: Heterozygote Mutation in B-CLL Fall 27.	48
Abbildung 6: Homozygote Mutation in der HL-Zelllinie KM-H2.	52
Abbildung 7: Schematische Darstellung und Elektropherogramm der TRAF3-Deletion in der HL-Zelllinie U-HO1.	52
Abbildung 8: Schematische Darstellung der untersuchten Regionen der <i>Upstream</i> - und <i>Downstream</i> -MYC-LDI-PCR.	55
Abbildung 9: Schematische Darstellung der MYC/SOCS1-Translokation im B-NHL-Fall 4 (MPI-248).	56
Abbildung 10: Schematische Darstellung der IgH/IMMP2L Translokation in Fall 10.	61
Abbildung 11: Schematische Darstellung der IgH/BCAS2 Translokation in Fall 17.	64
Abbildung 12: Schematische Darstellung der IgH/PVRL2-Translokation in Fall 19.	67
Abbildung 13: Säulendiagramm der Genexpression des PVRL2-Gens im Vergleich mit 15 anderen DLBCL-Fällen.	68
Abbildung 14: Schematische Darstellung der IgH/PVRL2-Translokation in Fall 19.	70
Abbildung 15: Ideogramm des Chromosom 6 mit einem Ausschnitt der annotierten Gene im Bereich 6p25.2.	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Resultat der TNFAIP3 Mutationsanalyse.	49
Tabelle 2: Mutationsanalyse des TRAF3-Gens in HL-Zelllinien und mikrodisezierten HRS- Zellen.	53
Tabelle 3: Zusammenfassung der Nicht-Ig/MYC-LDI-PCR.	57
Tabelle 4: Zusammenfassung der analysierten B-NHL-Fälle.	59
Tabelle 5: Zusammenfassung der amplifizierten Translokationen.	60
Tabelle 6: Lokalisation der annotierten Gene im Bereich um den IMMP2L-Locus und Genexpressionsvergleich mit anderen DLBCLs.	64
Tabelle 7: Lokalisation der annotierten Gene im Bereich um den BCAS2-Locus und Genexpressionsvergleich mit anderen DLBCLs.	66
Tabelle 8: Lokalisation der annotierten Gene im Bereich um den PVRL2-Locus und Genexpressionsvergleich mit anderen DLBCLs.	69

1. Einleitung

Das Immunsystem schützt den Organismus nicht nur vor körperfremden Pathogenen, wie Bakterien, Viren und Pilzen, sondern auch vor körpereigenen, potentiell gefährlichen Strukturen, die zu Tumoren oder Autoimmunerkrankungen führen können. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität entwickelt.

Die angeborene Immunität beruht auf unspezifischen Abwehrmechanismen, die sofort oder innerhalb weniger Stunden nach Erscheinen eines Antigens im Körper wirken. Dazu gehören z. B. physikalische Barrieren wie die Haut, das Komplementsystem und phagozytierende Zellen.

Die spezifische, adaptive Immunität zeichnet sich durch ihre Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Neben antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie Dendritischen Zellen, stellen zwei Gruppen von Zellen die wesentlichen Bestandteile des adaptiven Immunsystems dar:

Zum einen die T-Lymphozyten, die eine Rolle in der zellgebundenen Immunität spielen und zum anderen die B-Lymphozyten, die über Antikörper die humorale Immunantwort vermitteln.

T-Vorläuferzellen bilden sich im Knochenmark, von dort aus wandern sie in den Thymus, wo sie ausreifen. Reife T-Zellen werden aktiviert, indem sie mit ihrem membrangebundenen T-Zell-Rezeptor (TCR) antigene Peptide erkennen, die in Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) von APC präsentiert werden. Nach der Aktivierung differenzieren sich T-Zellen zu unterschiedlichen Effektorzellen aus. Zytotoxische T-Zellen erkennen und eliminieren erkrankte Zellen; T-Helferzellen stimulieren durch Zell-Zell-Kontakte und den von ihnen sezernierten Zytokinen andere Immunzellen und regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der T-Zell Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen. T-Zellen sind also für die zellvermittelte Zytotoxizität und die Steuerung der humoralen Immunantwort verantwortlich.

B-Zellen, die ebenfalls im Knochenmark entstehen und dort aus pluripotenten Stammzellen zu naiven B-Zellen heranreifen, binden in gelöster, ungebundener Form vorliegende Antigene direkt mit Hilfe ihres membrangebundenen B-Zell-Rezeptors (BCR). B-Zellen können in einer T-Zell abhängigen und in einer T-Zell unabhängigen Weise aktiviert werden, was schließlich zur Bildung von Antikörpern durch B-Zellen führt. Die Mehrheit der Immunreaktionen sind T-Zell abhängige Reaktionen, bei

denen es zur Interaktion zwischen B- und T- Zelle und antigenpräsentierender Zelle kommt. Dies führt zur Entwicklung von B-Zellen zu Plasmazellen, die in der Lage sind, hochaffine Antikörpermoleküle zu sezernieren und zu Gedächtnis-B-Zellen.

1.1 Die Entwicklung der B-Zellen

B-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Dort durchlaufen die B-Zellen verschiedene Entwicklungsstufen, während derer sie ihre Antigenspezifität erhalten. Dies wird durch verschiedenste Differenzierungssignale aus der Mikroumgebung des Knochenmarks induziert.

Im Knochenmark kommt es zur V(D)J-Rekombination, auch somatische Rekombination genannt, bei der es zur zufälligen Umlagerung von DNA-Abschnitten in den Genen der schweren und leichten Ketten der Antikörper kommt, um eine funktionsfähige variable Region (V-Region) der Antikörper zu erhalten. Die variablen Gensegmente setzen sich aus V und J Segmenten (V für *variable* und J für *joining*) für die leichten Ketten und zusätzlich dazu bei der schweren Kette aus D-Segmenten (D für *diversity*) zusammen.

Für die V(D)J-Rekombination sind spezifische, die V-, D- und J-Segmente flankierende Sequenzen wichtig, die Rekombinations-Signal-Sequenz (RSS). Die RSS besteht aus sieben konservierten Nukleotiden (Heptamer) gefolgt von einem 12 bp oder 23 bp Spacer, dem wiederum neun konservierte Nukleotide (Nonamer) folgen. Die RSS befinden sich am 3'-Ende der V-Gensegmente, am 5'-Ende der J-Gensegmente und an beiden Enden der D-Gensegmente. Die Rekombination wird zwischen solchen Gensegmenten eingeleitet, bei denen sich eine RSS-Sequenz mit einem 23 bp Spacer einer RSS-Sequenz mit einem 12 bp Spacer gegenüber steht (12/23 Regel). Das Enzymsystem, das die V(D)J-Rekombination katalysiert, wird als V(D)J-Rekombinase bezeichnet. Hierzu zählen insbesondere die lymphozyten-spezifischen Genprodukte RAG-1 und RAG-2 (Rekombination aktivierende Gene).

Eingeleitet wird die DNA-Umlagerung durch die Bindung von RAG-1 und RAG-2 an die Rekombinations-Signal-Sequenz und der Einführung eines DNA-Doppelstrangbruchs direkt zwischen dem Heptamer der RSS und dem dazugehörigen Gensegment (McBlane et al., 1995). Die Enden der zwei rekombinierenden Gensegmente werden in einem Komplex nahe zusammen gebracht und die Enden werden geschlossen, wobei es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur kommt. Im nächsten Schritt wird die Haarnadelstruktur

endonukleolytisch durch einen Schnitt des Einzelstranges geöffnet. Dieser Schnitt ist variabel und führt meist zu kurzen palindromischen Sequenzen (P Nukleotide), die zur Diversität der variablen Region beitragen. Am freien 3'-Ende des Einzelstranges werden durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) nicht-Keimbahn kodierte Nukleotide (N-Nukleotide) als weitere Modifikationen angehängt. Entsteht ein Bereich, in dem die Einzelstränge miteinander hybridisieren können, so werden die nicht gepaarten Nukleotide mit Hilfe einer Exonuklease abgebaut, die Lücke durch das DNA-Reparatursystem mit Nukleotiden aufgefüllt und mittels DNA-Ligase geschlossen. Die DNA-Ligase ligiert ebenfalls den herausgetrennten DNA Abschnitt an den Heptamersequenzen zu einem Zirkel, der später aus der Zelle verloren geht.

Neben RAG-1 und RAG-2 sind noch weitere DNA-modifizierende Enzyme beteiligt. Diese sind allgemein an der Reparatur und Modifikation von DNA beteiligt und werden ubiquitär exprimiert. Dazu gehören die DNA Ligase IV, DNA-abhängige Proteinkinase, Ku und Artemis (Ma et al., 2002). Durch die Modifikationen der verknüpften Enden der Gensegmente kann es passieren, dass das korrekte Leseraster verloren geht oder ein verfrühtes Stop-Kodon entsteht. Verläuft die Umlagerung der Gensegmente nicht produktiv, dann wird die Umlagerung auf dem zweiten Chromosom gestartet. Verläuft diese auch unproduktiv, so führt das zum Verlust der Zelle.

Die Folge einer produktiven V(D)J-Rekombination ist, dass B-Zellen mit einem nicht autoreaktiven B-Zell-Rezeptor (BCR) bei Erreichen des unreifen Stadiums das Knochenmark verlassen und in der Peripherie die Entwicklung zum reifen oder naiven Stadium fortführen (Rajewsky, 1996). Diese ganze Entwicklung vollzieht sich in der Abwesenheit von jeglichem Kontakt mit fremdem Antigen. Trifft dann eine reife, antigen-unerfahrene B-Zelle in der T-Zellzone der lymphatischen Organe mit ihrem BCR auf ein passendes Antigen, wird diese durch Co-Stimulation der T-Helferzellen aktiviert. Diese B-Zellen entwickeln sich dann entweder zu kurzlebigen Antikörper-seziernden Plasmablasten oder bilden durch intensive Proliferation und Einwanderung anderer Zellen sogenannte Keimzentren (Germinal Center GC).

GCs formieren sich durch proliferierende B-Zellen in den Follikeln peripherer lymphatischer Gewebe, wie der Milz, den Lymphknoten, Peyer'sche Plaques und den Tonsillen. Naive B-Zellen wandern in die T-Zell-reichen Zonen und werden dort als Resultat ihrer Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen und APCs aktiviert. Die Initiation der GC-

Antwort benötigt die Interaktion verschiedener Co-stimulierenden B-Zell-Oberflächen Rezeptoren mit Liganden, die durch T-Zellen und/oder antigenpräsentierende Zellen exprimiert werden. Ein wichtiger Faktor dabei ist CD40, ein Faktor aus der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor Familie, der von allen B-Zellen exprimiert wird, und sein Ligand CD154, der von T-Helferzellen exprimiert wird.

In den GC finden somatische Hypermutation (SHM) und Klassenwechsel (Class Switch Recombination CSR) statt, wodurch sich Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen entwickeln (MacLennan, 1994).

Die somatische Hypermutation (SHM) ist ein Prozess, der während einer Immunantwort in B-Zellen die variable Region der Immunglobuline (IgV) von rekombinierten Antikörpern modifiziert. SHM führt dazu, dass B-Zellen einen hochaffinen bindenden BCR entwickeln und diese dann positiv selektioniert werden. SHM ist mit DNA-Strangbrüchen assoziiert (Bross et al., 2000; Papavasiliou and Schatz, 2000) und führt meist zum einzelnen Nukleotid-Austausch in der IgV Region; es können aber auch kleinere Deletionen und Duplikationen auftreten (Goossens et al., 1998). Die Mutationsrate liegt dabei bei 10^{-3} pro Base pro Generation (Wagner and Neuberger, 1996). SHM benötigt die Aktivität der Aktivierungs-induzierten Cytidin-Deaminase (AID) (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000), einem Enzym, das die SHM initiiert, indem es Deoxycytidin-Reste der DNA desaminiert. Dadurch entstehen Uracil-Reste in einem der DNA-Stränge, die durch direkte Replikation oder durch die Uracil-DNA-Glykosylase unter Einführung von Mutationen beseitigt werden (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003).

Die SHM ist transkriptionsabhängig und umfasst die Region ungefähr 2 kb stromabwärts des Transkriptionsstarts des Immunglobulin-Gens. Transitionen dominieren dabei über Transversionen, und es wurden sogenannte Mutations-„Hot-Spots“ identifiziert, meist ein DGYW-Motiv; D steht dabei für Adenin (A), Guanin (G) oder Thymin (T), Y für Cytosin (C) oder Thymin und W für Adenin oder Thymin. Nur B-Zellen mit einem hochaffinen Antikörper-Rezeptor werden positiv selektioniert. B-Zellen, bei denen die Affinität des Rezeptors durch die Mutationen vermindert wird oder sogar verloren geht, sterben durch Apoptose.

SHM betrifft nicht nur die Antikörper-Gene, sondern kann auch in Nicht-Ig-Genen auftreten. Das bekannteste Beispiel ist das B-Cell-Lymphoma 6 (BCL6) Proto-Onkogen, dessen 5'-Regulatorische Region in einer Fraktion von GC- und

Gedächtnis-B-Zellen mutiert ist, allerdings nur mit einem Zehntel der Mutationsfrequenz der IgV-Region (Pasqualucci et al., 1998; Shen et al., 1998).

Ein Teil der GC-B-Zellen unterzieht sich der Klassenwechselrekombination. Dabei wird der Isotyp des exprimierten BCR gewechselt, was in einer Änderung der Effektorfunktion des Antikörpers resultiert, wobei die Spezifität des Antikörpers, die durch die rekombinierte V(D)J Region definiert wird, erhalten bleibt (Manis et al., 2002). Durch den Klassenwechsel werden die von naiven B-Zellen ursprünglich exprimierten Immunglobuline (Ig) IgM und IgD durch IgG, IgA oder IgE ersetzt. Während des Klassenwechsels kommt es zu einer intrachromosomalen Deletion, bei der die konstante IgM Region durch eine der stromabwärts gelegenen konstanten Genregionen (C-Gene) ersetzt wird (Wuerffel et al., 1997; Schrader et al., 2005).

Im Intron vor jeder konstanten Genregion (außer vor IgD) liegen konservierte, GC-reiche Regionen von 1 bis 10 kb Länge, die sogenannten Switch-Regionen. Während des Klassenwechsels kommt es zu Doppelstrangbrüchen in der Switch μ -Region und in einer der Switch-Regionen, die mit einem der stromabwärts gelegenen konstanten Gene assoziiert ist. Das DNA Fragment zwischen den beiden Switch-Regionen wird entfernt, und die Switch-Regionen werden so miteinander verknüpft, dass ein neues konstantes Gen stromabwärts der V(D)J-Kassette lokalisiert vorliegt. Die Reparatur der freien DNA-Enden geschieht durch nicht-homologe-Endverknüpfung (NHEJ). Die für den NHEJ essentiellen Proteine Ku70, Ku80 und der Ligase-Komplex XRCC4-Ligase IV sind ebenfalls wichtig für den Klassenwechsel. Die Rekombination erfolgt hier im Gegensatz zur V(D)J-Rekombination nicht an bestimmten Sequenzmotiven, sondern an palindromischen Bereichen, die verteilt in der Switch-Region vorliegen (Tashiro et al., 2001).

Der Klassenwechsel ist abhängig von steriler Keimbahntranskription durch den Switch-Locus unter Kontrolle der stromaufwärts der konstanten Gene liegenden Ig-Enhancer und Keimbahn-Promotoren (Jung et al., 1993; Zhang et al., 1993; Bottaro et al., 1998). Genauso wie für die SHM ist auch für den Klassenwechsel AID essentiell (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Die Switch-Transkripte bilden Schleifen aus RNA-DNA-Hybriden, die AID den Zugang auf dem verdrängten Strang ermöglichen (Chaudhuri et al., 2003; Ramiro et al., 2003; Yu et al., 2005).

1.2 Pathogenese maligner Lymphome

Maligne Lymphome sind eine Gruppe von Erkrankungen des lymphatischen Systems. Zu diesem gehören Lymphknoten, Tonsillen, Milz und Knochenmark. Aber auch andere Organe können betroffen sein. Die Erkrankung beruht auf malignen Transformationen von lymphatischen Zellen unterschiedlicher Reifungs- und Differenzierungsstufen.

Nach klinischen und histologischen Kriterien werden Lymphome in Hodgkin- (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Das HL ist gekennzeichnet durch den histologischen Nachweis von ein- und mehrkernigen Riesenzellen, den Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen). Alle anderen Lymphome, die nicht zu der Gruppe der HL gehören, werden unter dem Begriff NHL zusammen gefasst. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt NHLs weiterhin zwischen T-Zell-, NK-Zell- und B-Zell-Lymphomen und unterscheidet bei den B- und T-Zell-Lymphomen noch zwischen denen, die aus Vorläufer-B- oder -T-Zellen hervorgehen, oder solchen, die aus reifen B- oder T-Zellen entstehen. Außerdem werden diese Lymphome noch anhand ihrer histologischen, immunologischen und genetischen Parameter in zahlreiche Subtypen unterteilt. Die Mehrheit aller Lymphome besitzt einen B-Zell-Ursprung.

In der Pathogenese der Lymphome spielt das GC eine bedeutende Rolle. Das Vorkommen von somatischen Mutationen in den V-Regionen der Ig-Gene der B-Zell-NHL (B-NHL), dient als Marker für GC oder Post-GC Ursprung der Tumorzellen (Klein and Dalla-Favera, 2008). Darüber hinaus weist das Auftreten intraklonaler Heterogenität in den Ig-Genen auf eine weiterhin aktive SHM-Maschinerie hin, was für die Abstammung von GC-B-Zellen spricht und dazu auf eine Transformation der Tumor-Ursprungszellen im GC hinweist.

Die Keimzentrumsreaktion, die dem Organismus im Kampf gegen eindringende Mikroorganismen einen entscheidenden Vorteil bringt, birgt auch Risiken. So ist die Pathogenese von B-NHLs verbunden mit bestimmten genetischen Läsionen, wie chromosomalen Translokationen und aberrante SHM, die als Nebenprodukte der CSR oder SHM entstehen können. B-NHL werden oft durch chromosomale Translokationen charakterisiert, die den Ig-Locus betreffen und Bruchpunkte entweder in der Switch-Region oder in der Ziel-Region für SHM aufweisen (Küppers and Dalla-Favera, 2001; Küppers, 2005).

Die in B-NHL auftretenden Translokationen verursachen typischerweise die deregulierte Expression eines Proto-Onkogens, dadurch dass regulatorische Sequenzen vom heterologen Chromosom mit der intakten kodierenden Region des Zielgens verknüpft werden. Dies unterscheidet sich von dem, was man bei den meisten akuten Leukämien beobachten kann. Dort führen chromosomale Translokationen meist zu Fusionsgenen.

Es gibt Hinweise darauf, dass AID, ein für den CSR und SHM essentielles Enzym, ein Proto-Onkogen ist. So wurde gezeigt, dass AID im Prinzip Genom-weit wirken kann (Wang et al., 2004). Eine Verbindung zwischen dem AID Transkriptionslevel und dem Ausmaß der pathologischen Aktivität von AID wurde bei Studien mit AID-heterozygoten Mäusen mit reduziertem AID-mRNA und – Proteinlevel entdeckt, (McBride et al., 2008; Takizawa et al., 2008; Jiang et al., 2009). Im Hintergrund des Klassenwechsels zeigten die AID^{+/-} Lymphozyten eine beeinträchtigte Switch-Rekombination und eine Verminderung in der Frequenz der Mutationen und chromosomalen Brüche. Außerdem zeigte sich, dass die Kreuzung von AID defizienten Mäusen mit verschiedenen GC- und Post-GC-Lymphom-Maus-Modellen dazu führte, dass das Auftreten von Lymphomen stark reduziert wurde. Darüber hinaus traten in den AID defizienten Mäusen die für Lymphom-Maus-Modelle charakteristische IgH/c-Myc Translokation nicht auf (Ramiro et al., 2004; Pasqualucci et al., 2008).

Eine Ausnahme zu den SHM- und CSR-verknüpften Translokationen repräsentieren die Ig/BCL2 chromosomale Translokation im Follikulären Lymphom und die Ig/BCL1 Translokation im Mantelzell-Lymphom. Hier entstanden die Translokationen als Nebenprodukt der V(D)J-Rekombination (Tsujimoto et al., 1988; Stamatopoulos et al., 1999; Lieber et al., 2006). Die Orte maligner Transformationen sind also nicht ausschließlich auf das GC beschränkt.

SHM spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Lymphome, nicht nur aufgrund der Möglichkeit chromosomaler Translokationen, sondern auch weil sie nicht Ig-Gene betreffen kann (Pasqualucci et al., 2001). Diese sogenannte Aberrante Somatische Hypermutation (ASHM) führt Mutationen in die 5'- regulatorische Region verschiedenste Gene ein, darunter auch bekannte Proto-Onkogene wie MYC, PIM1 und BCL6. Oft kommt es dadurch zur deregulierten Expression dieser Gene (Pasqualucci et al., 2003). Zusätzlich führen Mutationen in der kodierenden Region

zu einem Aminosäureaustausch oder einem frühzeitigen Stop-Kodon, was die korrekte Funktion des Gens beeinflusst.

Ein Merkmal der GC-Zellen ist ihre überdurchschnittlich schnelle Proliferationsrate. Der Durchlauf eines Zellzyklus dauert bei ihnen nur 6 - 12 Stunden (Allen et al., 2007). Diese starke Proliferation stellt ein Risiko für maligne Transformationen dar, denn die Reparatur von DNA-Schäden wird in GC-Zellen unterdrückt (Phan and Dalla-Favera, 2004). Diese kurzzeitige Toleranz gegenüber DNA-Schädigungen im GC wird den Zellen durch die Expression des keimzentrumspezifischen transkriptionellen Repressors BCL6 ermöglicht (Cattoretti et al., 1995; Allman et al., 1996). BCL6 supprimiert Apoptose und Zellzyklusarrest, indem es die Transkription von p53 direkt unterdrückt (Phan and Dalla-Favera, 2004).

Das BCL6 Gen wurde ursprünglich über seine Beteiligung an chromosomalen Translokationen in B-Zell Lymphomen entdeckt (Ye et al., 1993), was zu einer deregulierten, konstitutiven Expression von BCL6 führt. Die Konsequenz daraus ist, dass GC-Zellen in ihrer Differenzierung gestoppt werden und somit in ihrem proliferativen und DNA-Schädigungen tolerierendem Zustand bleiben, womit die Zellen weitere genetische Veränderungen ansammeln können, die zu einer Lymphomentwicklung führen.

Andererseits sind GC-Zellen aber auch besonders anfällig für Apoptose. Sie exprimieren nicht den anti-apoptotischen Faktor BCL2, wohingegen viele proapoptotische Faktoren exprimiert werden (Klein et al., 2003). Dies erlaubt den Zellen eine schnelle Entfernung von B-Zellen mit einem Nicht-bindenden Antikörper. In-vivo wurde gezeigt, dass GC-Zellen durch CD40 Stimulation vor dem Zelltod bewahrt werden können (Liu et al., 1989). CD40 Stimulation führt zur Aktivierung des NF- κ B Komplexes, der unter anderem die Expression zahlreicher anti-apoptotischer Gene kontrolliert (Hayden and Ghosh, 2008). Es hat sich gezeigt, dass die konstitutive Ausprägung von NF- κ B eine pathologische Besonderheit vieler Lymphome ist.

Die NF- κ B-Signalgebung wird unterschieden in den „klassischen“ und dem „alternativen“ Signalweg. Die NF- κ B Transkriptionsfaktoren sind Homo- und Heterodimere aus fünf verschiedenen Proteinen (c-Rel, p50, p52, RelB, p65/RelA). In unstimulierten Zellen liegen die Dimere im Zytoplasma an Inhibitoren, den I κ Bs, gebunden vor. Nach Stimulation der Zellen durch den BCR oder Tumor-

Nekrosefaktor-Rezeptor-Familienmitglieder (TNF), wie z. B. CD40, kommt es zur Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), was zur Phosphorylierung und Degradierung der I κ Bs führt. Die nun freien NF- κ B-Dimere wandern in den Kern, wo sie die Transkription zahlreicher Zielgene initiieren (Abbildung 1).

Im „klassischen“ Signalweg phosphoryliert I κ B Kinase β (IKK β) den Inhibitor I κ B α und reguliert hauptsächlich die p50/p65 und die p50/c-Rel Dimere. Im „alternativen“ Signalweg phosphoryliert IKK α den Vorläufer der p52-Untereinheit p100 und reguliert damit die p52/RelB Dimere.

NF- κ B-Aktivität bietet Tumorzellen einen Selektionsvorteil, da dieser Signalweg zur Blockade von Apoptose führt. Die Unterdrückung dieses Signalweges wird deshalb als vielversprechender Therapieansatz gesehen (Packham, 2008).

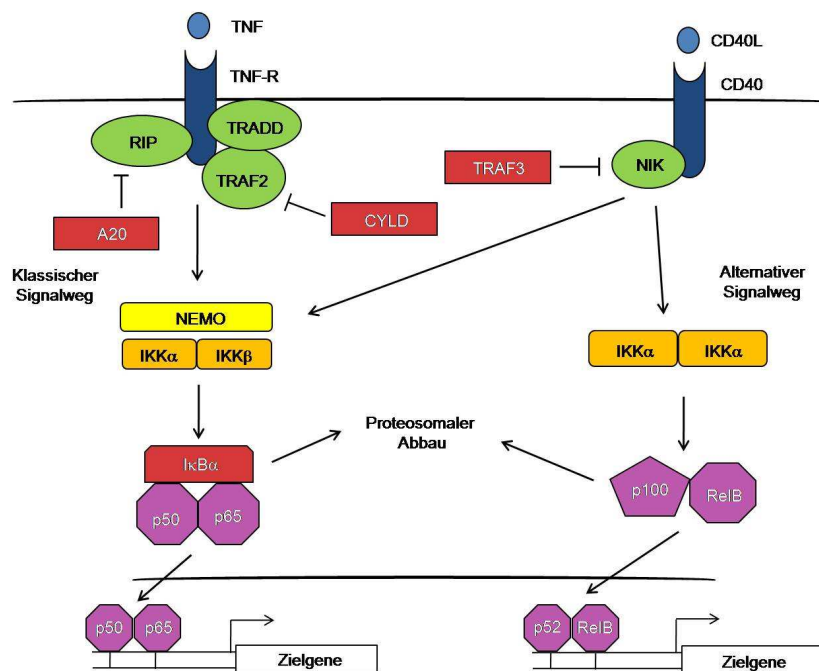


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema des NF- κ B-Signalweges.

Abgebildet ist die Regulation des NF- κ B-Signalweges im klassischen und alternativen Weg am Beispiel des Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) und CD40. Im klassischen Weg bildet sich bei Aktivierung des TNF-R durch TNF am Rezeptor ein Komplex aus TRAF2, TRADD und RIP. Dies führt zur Aktivierung von TRAF2 und dadurch zur Aktivierung des NEMO-IKK α -IKK β -Komplexes. Dieser Komplex phosphoryliert I κ B α , das daraufhin proteasomal degradiert wird. Dadurch werden die NF- κ B-Heterodimere p50/p65 freigesetzt, die in den Kern wandern und dort die Ausprägung ihrer Zielgene aktivieren. Im alternativen Signalweg wird IKK α nach Phosphorylierung durch NIK aktiviert und phosphoryliert wiederum p100. Dieses wird partiell zu p52 degradiert, das als Dimer mit RelB in den Zellkern wandert und verschiedene Zielgene aktiviert. Gezeigt sind auch die Inhibitoren von NF- κ B: A20, CYLD und TRAF3. A20 inhibiert RIP und beschleunigt seine Degradation. Es hemmt nicht nur NF- κ B-Aktivierung über TNF-R sondern auch CD40-vermittelte Aktivität. CYLD hemmt TRAF2 und TRAF3 wirkt als negativer Regulator von NIK.

1.3 B-Zell-Non-Hodgkin Lymphome

Als NHL werden alle malignen Lymphome zusammengefasst, bei denen es sich nicht um ein Hodgkin Lymphom handelt. Zu den am weitesten verbreiteten NHL gehören das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom, was etwa 30% aller Lymphome ausmacht, das Follikuläre Lymphom (22%), die B-Zell-Chronische lymphozytische Leukämie (7%), das Mantel-Zell-Lymphom (6%) und das Burkitt-Lymphom, das vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt und dort fast 35% der Lymphome ausmacht. (Fisher, 2003).

1.3.1 Das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom

Das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom (DLBCL) zählt zu den aggressiven Lymphomen und ist der am weitesten verbreitete Typ der NHL. Es repräsentiert ungefähr ein Drittel aller NHL weltweit (The-Non-Hodgkin's-Lymphoma-Classification-Project, 1997), wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Als Therapie wird eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) plus Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20-positive Zellen, eingesetzt, was in ungefähr 50% der Fälle zu einer Heilung führt (Lenz and Staudt, 2010).

Die Tumorzellen im DLBCL sind oft dreimal so groß wie normale Lymphozyten. Es werden verschiedene morphologische Varianten unterschieden. Im Zentroblastischen Typ (80% der Fälle) besitzt der Tumor Zellen, die an proliferierende GC-Zellen erinnern. Der Immunoblastische Typ (ungefähr 10% der Fälle) hat mehr als 90% Immunoblasten. Im Anaplastischen Typ sind die Zellen morphologisch ähnlich zu denen im anaplastisch großzelligen T-Zell Lymphom. Das Plasmablastische DLBCL betrifft häufig HIV-positive Patienten.

Das DLBCL ist ein klinisch und biologisch heterogenes Lymphom. Die molekulare Pathogenese des DLBCL ist komplex und verschiedene Mechanismen der genetischen Läsionen sind daran beteiligt, wie chromosomale Translokationen, ASHM, Genamplifikationen und Deletionen.

Durch Genexpressionsanalysen konnte das DLBCL unabhängig von der Histologie in zwei Subtypen unterteilt werden: Den ABC (*activated B-cell*) -Typ und den GCB (*germinal center B-cell*) -Typ (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2002; Rosenwald et al., 2003; Wright et al., 2003). Diese Subtypen unterscheiden sich in der Expression tausender Gene und entstehen aus B-Zellen, die sich in

unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden. Rosenwald et al. unterschied zusätzlich zum GCB- und ABC-Typ noch die unklassifizierte Risikogruppe Typ 3, der kein Gen-Set zugeordnet werden konnte (Rosenwald et al., 2002). Der GCB-Typ exprimiert vor allem Gene, die charakteristisch für GC-B-Zellen sind und der ABC-Typ exprimiert Gene, die typisch für *in vitro* aktivierte periphere B-Zellen sind. Patienten mit einem GCB-Typ haben eine signifikant bessere Prognose.

Die DLBCL-Typen stammen nicht nur von unterschiedlichen Differenzierungsstadien der B-Zellen ab, sondern zeigen auch verschiedene Mechanismen der malignen Transformation. So wurde die Ig/BCL2 Translokation und die Amplifikation des c-rel Locus ausschließlich im GCB-Typ gefunden (Huang et al., 2002; Iqbal et al., 2004), dagegen findet sich eine konstitutive Aktivität von NF- κ B ausschließlich im ABC-DLBCL (Davis et al., 2001). Die konstitutive Aktivität des NF- κ B-Signalweges führt zur Expression des Transkriptionsfaktor IRF4 in den ABC-Lymphomen, was die Zellen in Richtung Plasmazell-Differenzierung treibt (Davis et al., 2001; Lam et al., 2005), allerdings besitzen sie auch weitere genetische Läsionen, die eine vollständige Differenzierung zu Plasmazellen blockieren (Pasqualucci et al., 2006; Iqbal et al., 2007).

Beide DLBCL-Typen zeigen somatische Mutationen in der variablen Region der Ig-Gene, wobei GCB-DLBCL aktive SHM zeigt (Lossos et al., 2000).

Die chromosomale Translokation von 3q27, dem Locus des BCL6 Gens, ist die häufigste und charakteristischste genetische Anomalität und tritt in 30 - 40% der DLBCL auf (Lo Coco et al., 1994). BCL6 Translokationen wurden interessanterweise hauptsächlich im ABC-Typ gefunden (Iqbal et al., 2007). Die Genausprägung dagegen beschränkt sich auf den GCB-Typ. Die Translokationen treten üblicherweise in der hoch konservierten regulatorischen Region des BCL6 Gens auf, der Hauptbruchpunktregion (MBR). Dieser Bereich deckt den Promotor, das erste nicht-kodierende Exon und die 5'-Region des ersten Introns ab (Akasaka et al., 2000). Die Folge der Translokation ist deshalb Promotor-Substitution. Die Partner der BCL6 chromosomalen Translokation sind meistens die Ig-Gene auf Chromosom 14q32, 2p12 und 22q11, es wurden aber auch schon weitere Chromosomen als Partner identifiziert (Akasaka et al., 2000).

In über 50% der DLBCL kommt es zu ASH von Proto-Onkogenen wie c-MYC, PIM1, PAX5 und RhoH/TTF, die eine Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und Signaltransduktion spielen (Pasqualucci et al., 2001). Außerdem wurden vor

kurzem in fast 50% der DLBCL-Fälle Mutationen und Deletionen im Tumorsuppressorgen A20 gezeigt (Compagno et al., 2009; Honma et al., 2009).

DLBCLs besitzen eine große Varianz an Translokationen, chromosomalen Deletionen und Zugewinnen, bei denen die Zielgene, die in die Pathogenese dieses Lymphoms involviert sind, bis heute noch nicht identifiziert wurden.

Das primäre mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBL) macht etwa 5% aller aggressiven Lymphome aus und wird als spezifischer Subtyp den DLBCL zugerechnet. Die globalen Expressionsstudien dieses Lymphoms weisen auf eine Ähnlichkeit zur ABC-Untergruppe hin. Noch größere Ähnlichkeit hat das PMBL jedoch zum HL (Rosenwald et al., 2003; Savage et al., 2003). Über ein Drittel der Gene, die PMBL von DLBCL unterscheiden, sind ebenfalls in HL exprimiert.

Der NF- κ B-Signalweg ist im PMBL genauso konstitutiv aktiv wie in ABC-DLBCL und HL und der Tumorsuppressor A20 scheint auch hierbei von großer Bedeutung zu sein (Schmitz et al., 2009a). Im Gegensatz zu den anderen DLBCL Untergruppen ist für das PMBL die Amplifikation des REL-Onkogen auf Chromosom 9p und die Überexpression des MAL Gen auf Chromosom 2p charakteristisch (Copie-Bergman et al., 1999; Weniger et al., 2007).

1.3.2 Das Follikuläre Lymphom

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist der zweithäufigste Typ von NHLs in der westlichen Welt. Es gehört zu den indolenten (langsam wachsenden) Lymphomen. In einem Drittel der Fälle kann es sich aber zu einem aggressiven Lymphom (z. B. DLBCL) transformieren (Bende et al., 2007). Die variablen Regionen der Immunglobuline zeigen somatische Mutationen und weisen durch intraklonale Diversität eine aktive SHM auf, somit stammt das FL von GC-B-Zellen ab (Bahler and Levy, 1992).

Das initiiierende transformierende Ereignis ist in mehr als 80% der Fälle eine t(14;18)-Translokation, die typischerweise während einer fehlerhaften V(D)J-Umlagerung entsteht. Durch die Translokation gelangt das BCL2-Gen unter die Kontrolle der Ig-Enhancer und wird dadurch konstitutiv exprimiert (Bende et al., 2007). Die deregulierte Expression des BCL2-Gens im GC trägt durch die Aufhebung vieler apoptotischer Signalwege wahrscheinlich zum Überleben der FL-Vorläuferzelle bei (Vaux et al., 1988; McDonnell et al., 1989; Yang and Korsmeyer, 1996). Versuche in transgenen Mäusen zeigten, dass die konstitutive Expression von BCL2 zwar nötig aber nicht alleine für die Entstehung von follikulären Lymphomen verantwortlich ist

(McDonnell et al., 1989; Strasser et al., 1990; McDonnell and Korsmeyer, 1991; Strasser et al., 1993). Ein weiteres transformierendes Ereignis ist bislang nicht bekannt.

1.3.3 Die B-Zell-chronische lymphozytische Leukämie

Die B-Zell-chronische lymphozytische Leukämie (CLL) ist in der westlichen Welt die am häufigsten vorkommende Leukämieform und tritt vor allem im höheren Lebensalter auf. Die CLL ist charakterisiert durch die Ansammlung von CD5⁺ B-Zellen mit einem reifen Erscheinungsbild in Blut, Knochenmark, Lymphknoten oder anderen lymphatischen Organen (Zenz et al.).

CLL tritt in zwei Untergruppen auf, die aufgrund des Auftretens von Mutationen in den variablen Regionen der Immunglobuline unterschieden werden (Schroeder and Dighiero, 1994). Patienten mit unmutierten IgV-Genen weisen eine schlechtere Prognose auf als Patienten mit mutierten Genen (Damle et al., 1999). Ein weiterer wichtiger negativer Prognosefaktor ist die Expression der Proteintyrosinkinase ZAP-70, die eine wichtige Rolle im T-Zellrezeptor-Signalweg spielt. ZAP-70 wird ausschließlich in der unmutierten CLL Untergruppe exprimiert (Rosenwald et al., 2001; Crespo et al., 2003).

In vielen Fällen der CLL zeigt sich eine Deletion in der chromosomalen Region 13q14, diese umfaßt den Genlocus der microRNAs miR-15a/16-1, deren Ausprägung in der Mehrzahl der CLL-Fälle fehlt (Calin et al., 2002). Diese microRNAs spielen eine Rolle bei der Ausprägung des BCL2-Gens (Cimmino et al., 2005).

Für das Überleben und das Wachstum der CLL-Zellen scheint die NF- κ B-Aktivität und der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) -Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen (Cuni et al., 2004).

1.3.4 Das Mantelzell-Lymphom

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) macht ungefähr 6% aller B-NHLs aus. Die Tumorzellen des MCL leiten sich von den Zellen der Mantelzone eines Keimzentrums ab. Es gilt als eines der aggressivsten B-NHL, die Heilungsraten sind sehr niedrig. Das genetische Markenzeichen der MCL ist die Ig-assoziierte Translokation des BCL1-Gens, die in so gut wie allen Fällen der MCL auftritt und im weiteren Verlauf zur Überexpression des Cyclin D1 (Synonym für BCL1) führt

(Motokura et al., 1991; Bosch et al., 1994; de Boer et al., 1995), welches eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus spielt.

1.3.5 Das Burkitt Lymphom

Das Burkitt Lymphom (BL) gehört zu den aggressiven Lymphomen und wird von der WHO in drei klinische Varianten unterteilt: Das endemische BL, das sporadische BL und das humane immundefiziente Virus (HIV)-assoziierte BL.

Das endemische BL tritt meist in Afrika bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und ist in mehr als 95% der Fälle mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert (Kutok and Wang, 2006). Das sporadische BL tritt hauptsächlich in den Vereinigten Staaten und Westeuropa auf (Harris et al., 1994). Das HIV-BL betrifft HIV-infizierte Personen.

Anders als bei dem endemischen BL sind nur einige Fälle des sporadischen und des HIV-assoziierten BL mit EBV assoziiert.

Die Expression von CD10 und BCL6 zeigen den GC-Ursprung des BL (Hecht and Aster, 2000). Dies wird noch bestätigt durch Sequenzanalysen der variablen Ig-Gene im endemischen, sporadischen und HIV-assoziierten BL, bei der somatische Mutationen der Ig-Gene, teilweise sogar noch aktive SHM, nachgewiesen werden konnten (Chapman et al., 1998). Das BL ist einer der am schnellsten wachsenden Tumore und hat eine außerordentlich hohe Zellteilungsrate.

Alle BL weisen die chromosomale Translokation des MYC-Gens auf Chromosom 8 unter Beteiligung der Ig-Gene auf (Hummel et al., 2006). Die Translokation führt zu einer Deregulation des MYC-Gens. Neben der Translokation des MYC-Gens wurden auch in 40% der BL Mutationen des TP53-Gens beschrieben (Gaidano et al., 1991; Ichikawa et al., 1993).

1.4 Das Hodgkin Lymphom

Das HL ist das am häufigsten vorkommende Lymphom in der westlichen Welt und betrifft vor allem junge Erwachsene.

Aufgrund morphologischer und immunophenotypischer Kriterien kann man das nodulär Lymphozyten-prädominante HL (NLPHL), das in etwa 5% der Fälle vorliegt, von dem cHL (95% der Fälle) unterscheiden. In über 40% der cHL-Fälle sind die Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert (Kutok and Wang, 2006).

Nach der WHO Klassifikation werden vier Untergruppen des cHL nach Phänotyp der Zellen und dem histologischen Bild unterschieden: nodulär sklerotisierendes HL, gemischtzelliges HL, lymphozytenreiches HL und lymphozytenarmes HL.

cHL ist charakterisiert durch das Auftreten von großen multinukleären HRS - Zellen und NLPHL durch LP-Zellen. Diese Zellen repräsentieren meist nur 1% der Tumormasse, während die Mehrheit der restlichen Zellen aus T-Lymphozyten, B-Lymphozyten Plasmazellen, Eosinophilen, Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen besteht (Weiss et al., 2007).

Aufgrund des komplexen Immunophänotyps und der Seltenheit der Zellen war der Ursprung der HL Zellen lange Zeit unbekannt. Durch Einzelzellanalysen der variablen Immunoglobulingene (IgV) von HRS und LP-Zellen konnten klonale IgV-Genrekombinationen gezeigt werden und somit der B-Zell Ursprung der Tumorzellen demonstriert werden (Küppers et al., 1994; Kanzler et al., 1996; Braeuninger et al., 1997; Marafioti et al., 1997; Marafioti et al., 2000). So gut wie alle Fälle des cHL und NLPHL zeigten somatisch mutierte V-Gene, was auf einen post-GC-Ursprung schließen läßt. Durch den Nachweis einer aktiven somatischen Hypermutation in NLPHL konnte der direkte Ursprung der LP-Zellen aus GC-B-Zellen gezeigt werden (Küppers et al., 1994; Braeuninger et al., 1997; Marafioti et al., 1997).

In HRS-Zellen wurden in einem Viertel der Fälle inaktivierende Mutationen in den IgV-Genen, wie Stop-Kodons, Deletionen oder Insertionen nachgewiesen. Deletionen und Insertionen führen zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zur Funktionsunfähigkeit des IgV-Gens (Braeuninger et al., 2006). B-Zellen, die ihre Ausprägung des BCR verlieren, werden normalerweise durch Apoptose eliminiert. Die Identifikation von destruktiven Mutationen in den HRS-Zellen deutet deshalb darauf hin, dass sie von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abstammen (Kanzler et al., 1996; Lam et al., 1997; Braeuninger et al., 2006).

In einigen selteneren Fällen (2%) haben HRS-Zellen einen T-Zell Ursprung (Muschen et al., 2000; Seitz et al., 2000).

Auch wenn HRS-Zellen von B-Zellen abstammen, prägen HRS-Zellen kaum B-Zell spezifische Proteine aus (Schwering et al., 2003). Es fehlen zahlreiche B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren wie z.B. Pu.1, Oct-2 und BOB1 (Jundt et al., 2002b). Dafür werden Proteine anderer Zelllinien aberrant exprimiert, wie z. B. Notch1 (Jundt et al., 2002a; Jundt et al., 2008). Notch1 ist essentiell für die T-Zell Entwicklung und unterdrückt die B-Zell-Entwicklung (Radtko et al., 2004). Da B-

Zellen ohne funktionsfähigen BCR durch Apoptose eliminiert werden, ist der Verlust der B-Zell spezifischen Genexpression sicherlich von Vorteil für die BCR-losen Vorläuferzellen der HRS-Zellen.

Konstitutive Ausprägung des NF- κ B Signalweges spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese und dem Überleben der HRS-Zellen (Bargou et al., 1997; Izban et al., 2001). Auch die LP-Zellen des NLPHL zeigen Ausprägung von vielen Zielgenen des NF- κ B-Signalweges ((Brune et al., 2008).

Verschiedene NF- κ B aktivierende Rezeptoren, wie CD40, CD30 und RANK, werden von HRS-Zellen exprimiert, während ihre Liganden durch andere Zellen des Tumordinfiltrats exprimiert werden (Carbone et al., 1995b; Carbone et al., 1995a; Fiumara et al., 2001; Horie et al., 2002b). In EBV-positiven Fällen kann ein vom EBV exprimiertes Protein (LMP1) ebenfalls zur NF- κ B Aktivierung beitragen, indem es den CD40 Rezeptor imitiert (Gires et al., 1997; Kieser et al., 1997).

Ein weiterer aktiver Signalweg in HRS-Zellen stellt der JAK/STAT-Signalweg dar. Konstitutive Ausprägung von STAT-Proteinen, wie STAT3, STAT5 und STAT6 wurden in HRS-Zellen nachgewiesen (Kube et al., 2001; Skinnider et al., 2002). Zytokinsignale führen zur Aktivierung der Januskinasen (JAK), welche wiederum STAT-Proteine phosphorylieren. Diese dimerisieren, wandern in den Zellkern und aktivieren die Transkription ihrer Zielgene (O'Shea and Murray, 2008).

HRS-Zellen zeigen chromosomale Anomalitäten in allen Fällen des cHL (Weber-Matthiesen et al., 1995). Dies zeigt die große chromosomale Instabilität der HRS-Zellen. Allerdings finden sich auch wiederkehrende chromosomale Aberrationen, wie der Zugewinn von Chromosom 2p in fast 50% der HL, was den Bereich des NF- κ B Gens c-Rel umfaßt (Joos et al., 2002; Martin-Subero et al., 2002). Ebenfalls wurden inaktivierende Mutationen in den I κ B α - und den I κ B ϵ -Genen gefunden (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Jungnickel et al., 2000; Emmerich et al., 2003). Außerdem konnten vor kurzem inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressors A20 in 44% der cHL-Fälle nachgewiesen werden (Schmitz et al., 2009a), was sicherlich zu einem beträchtlichen Anteil zur konstitutiven Ausprägung des NF- κ B Signalweges beiträgt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl seit der Erstbeschreibung der verschiedenen NHLs und des HL zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen zu einem weiten Verständnis über die Pathogenese der Lymphome geführt haben, sind noch längst nicht alle transformierenden Ereignisse bekannt oder ausreichend geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, weitere genetische Läsionen zu identifizieren und zu charakterisieren, die an der Transformation verschiedener NHL und der HRS-Zellen beteiligt sind.

Ig-assoziierte Translokationen stellen entscheidende transformierende Ereignisse in vielen B-NHL dar (Willis und Dyer, 2000; Küppers und Dalla-Favera, 2001). So sind die Ig/BCL1-Translokation ein Kennzeichen fast aller Mantelzell-Lymphome und c-MYC-Translokationen charakterisieren das endemische BL.

So sind viele Onkogene durch ihre Beteiligung an Ig-assoziierten Translokationen identifiziert worden. Auch jetzt noch werden neue Gene identifiziert, die an der Pathogenese der B-NHL beteiligt sind.

Das MYC Proto-Onkogen gilt als eines der am häufigsten aktivierten Onkogen (Nesbit et al., 1999) c-Myc spielt eine Rolle bei vielen Aspekten der zellulären Homöostase und die Aktivität dieses Gens ist normalerweise stark reguliert. Diese Kontrolle wird aber z. B. im BL durch die Ig/c-MYC-Translokation überwunden. Im Rahmen des Verbundes „Molekulare Mechanismen maligner Lymphome“ (MMML) wurden einige BL-Fälle identifiziert, die MYC-Translokationen mit unbekanntem Partnergen aufwiesen.

Deshalb wurden Translokationen in einer größeren Anzahl von B-NHL-Primärfällen mit Hilfe geeigneter sensitiver PCR-Techniken, wie der LDI-PCR, auf neue Gene hin untersucht, die bei der Lymphompathogenese eine potentielle Rolle spielen.

Da nicht nur Translokationen, sondern auch Genmutationen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von NHL und HL haben, wurde untersucht, ob in HL-Zelllinien und cHL-Primärfällen Mutationen im TRAF3-Gen für die konstitutive Ausprägung des NF- κ B-Signalweges im cHL von großer Bedeutung sind.

Weiterhin wurde vor kurzem durch Mutationsanalysen im TNFAIP3-Gen gezeigt, dass dieses Gen ein bedeutender Tumorsuppressor in einem Teil der DLBCL, dem primären mediastinalen B-Zell-Lymphom (PMBL), dem Lymphom des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom) und im cHL ist (Compagno

et al., 2009; Honma et al., 2009; Kato et al., 2009; Novak et al., 2009; Schmitz et al., 2009a; Chanudet et al., 2010). Dadurch war es von großem Interesse, ob ebenfalls in der B-Zell-chronischen lymphozytischen Leukämie (CLL) inaktivierende Mutationen im TNFAIP3 Gen vorliegen, die dazu führen, dass in einem großen Teil der CLL-Fälle der NF- κ B-Signalweg konstitutiv aktiv ist (Furman et al., 2000; Cuni et al., 2004)

2. Material und Methoden

2.1 DNA-Arbeitstechniken

2.1.1 DNA-Präparation

Die Gewinnung von DNA aus Geweben und Zellmengen zwischen $250 - 1 \times 10^6$ Zellen wurde nach dem Prinzip der Protein-Aussalzung und Alkohol-Fällung mit dem *Gentra Pure Gene Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde anhand der Absorption bei 260 nm mit einem UV-Spektrometer bestimmt. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der DNA-Lösung hergestellt und gegen TE-Puffer gemessen. Zur Beurteilung des Reinheitsgrades der DNA wurde der Quotient aus der Absorption von 260 nm und der Absorption von 280 nm herangezogen. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine hohe Reinheit der DNA. Die Konzentration der DNA wurde aus der gemessenen Absorption nach dem Lambert Beer Gesetz bestimmt, nach welchem eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht:

$$A = c * d * \epsilon$$

A: Absorption, c: DNA-Konzentration, d: Schichtdicke der Küvette (1 cm), ϵ : Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA bei 260 nm.

2.1.3 Langstrecken-Inverse-(LDI)-PCR zur Analyse von IgH- und c-Myc-assoziierten Translokationen

Die LDI-PCR bietet eine elegante Möglichkeit, um Translokationen zu amplifizieren, bei denen eine unbekannte Sequenz mit einer bekannten Sequenz verknüpft wurde. Das Prinzip der LDI-PCR beruht auf der endonukleatischen Restriktion des genomischen Fragmentes, das den Translokationsbruchpunkt enthält, und der anschließenden Ligation des Fragmentes zu einem Zirkel mit Hilfe einer DNA-Ligase. Die Ligation erfolgt mit einer geringen Konzentration an DNA, um die Bildung eines Zirkels gegenüber der Ligation zweier verschiedener Fragmente zu bevorzugen. Mit Hilfe eines Primerpaares, das in entgegengesetzter Richtung auf der bekannten Sequenz bindet, wird ein PCR-Produkt amplifiziert, welches das unbekannte

Translokationsprodukt enthält, das von der bekannten Sequenz auf beiden Seiten flankiert wird.

Für die LDI-PCR zur Analyse von IgH- und c-Myc-assoziierten Translokationen wurde eine DNA-Menge von 0,75 ng – 10 ng eingesetzt. Als Restriktionsenzyme für die JH-LDI-PCR dienten *HindIII*, *PaeI*, *MunI* und *XbaI*; für die S μ -LDI-PCR *HindIII*, *PaeI*, *BglII* und *MunI*; für die S γ -LDI-PCR *HindIII*, *PaeI*, *Mph1103I* und *Bsp1407I* und für die S α -LDI-PCR *VspI*, *HindIII*, *NdeI* und *KpnI*. Für die S γ -LDI-PCR wurde eine zusätzliche Restriktion mit *PstI* durchgeführt, um sogenannte Keimbahn-Nebenprodukte auszuschließen, da die Immunglobulin-Gamma-Gene (IgG) für die verwendeten Restriktionsenzyme in der Keimbahnsequenz teilweise im 5'-Bereich der Switch-Regionen die gleichen Zielsequenzen aufwiesen. Dies führt zu einer internen Ligation der Keimbahnsequenz, was dann als Keimbahn-Nebenprodukt in der abschließenden PCR bevorzugt vor eventuellen Translokationsprodukten des anderen Allels amplifiziert wird.

Als Restriktionsenzyme für die *Upstream*- und *Downstream*-c-Myc-LDI-PCR wurden die Restriktionsenzyme *Bsp1407I*, *MunI*, *EcoRI* und *NcoI* verwendet.

Die Restriktionen wurden mit jeweils 2 U Enzym in einem Reaktionsansatz von 10 μ l 2 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 68°C für 20 Min. Für die Ligation wurden 1 U (Weiss) T4-DNA-Ligase und der entsprechende Puffer zugesetzt und für 2 h bei 22°C inkubiert.

Nach einer Isopropanol-Fällung unter Zugabe von 10 ng/ml Glycogen (*Roche*) wurde die gefällte DNA in 10 μ l Tris pH 8,5 gelöst und in die erste Runde der PCR eingesetzt. Nach Vollendung der PCR-Reaktion wurden 2 μ l daraus für eine zweite Runde eingesetzt. Im Anschluß wurde das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet, die entstandenen Produkte isoliert und sequenziert.

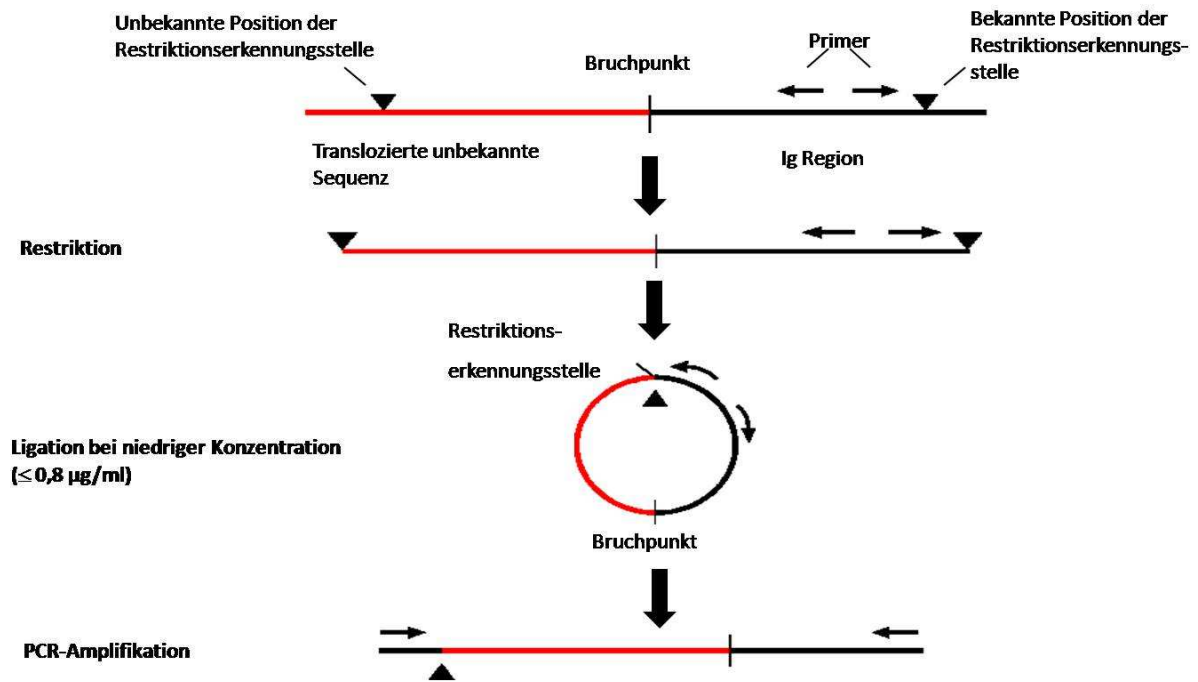


Abbildung 2: Prinzip der Langstrecken-Inversen-(LDI)-PCR.

PCR-Bedingungen

Ansatz 1. Runde:

- 0,6 μl dNTPs (je 2,5 mM)
- 9 μl 3,3 x rTth-Puffer
- 1,0 μl $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ (25 mM) (*Applied Biosystems*)
- 0,6 μl 1. Runden Forward Primer (10 μM)
- 0,6 μl 1. Runden Reverse Primer (10 μM)
- 6,0 μl Betain (5 M)
- 1,9 μl H_2O
- 10 μl Ligationsansatz
- 0,3 μl rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/ μl) (*Applied Biosystems*)

PCR-Programm der 1. Runde: 95°C 3:30 Min., 85°C Pause (Enzymzugabe), 35 Zyklen (95°C 45 Sek., x°C 45 Sek., 68°C 8 Min.), 72°C 15 Min., 10°C Pause

x: Temperatur für die Primerhybridisierung der verschiedenen Primer:

S μ -LDI-PCR: 66°C

JH-LDI-PCR: 66°C

Alpha-LDI-PCR: 61°C

Gamma-LDI-PCR: 65°C

Myc-LDI-PCR: 64°C

Ansatz der 2. Runde:

0,6 µl dNTPs (je 2,5 mM)

9 µl 3,3 x rTth-Puffer

1 µl Mg(OAc)₂ (25 mM)

0,6 µl 2. Runden Forward Primer (10 µM)

0,6 µl 2. Runden Reverse Primer (10 µM)

6 µl Betain (5 M)

9,9 µl H₂O

2 µl des 1. Rundenproduktes

0,3 µl rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/µl) (Applied Biosystems)

PCR-Programm der 2. Runde: 95°C 3:30 Min., 85°C Pause (Enzymzugabe), 45 Zyklen (95°C 45 Sek., x°C 45 Sek., 68°C 8 Min.), 72°C 15 Min., 10°C Pause

x: Temperatur für die Primerhybridisierung der verschiedenen Primer

Sp-LDI-PCR: 64°C

JH-LDI-PCR: 64°C

Alpha-LDI-PCR: 61°C

Gamma-LDI-PCR: 65°C

Myc-LDI-PCR: 64°C

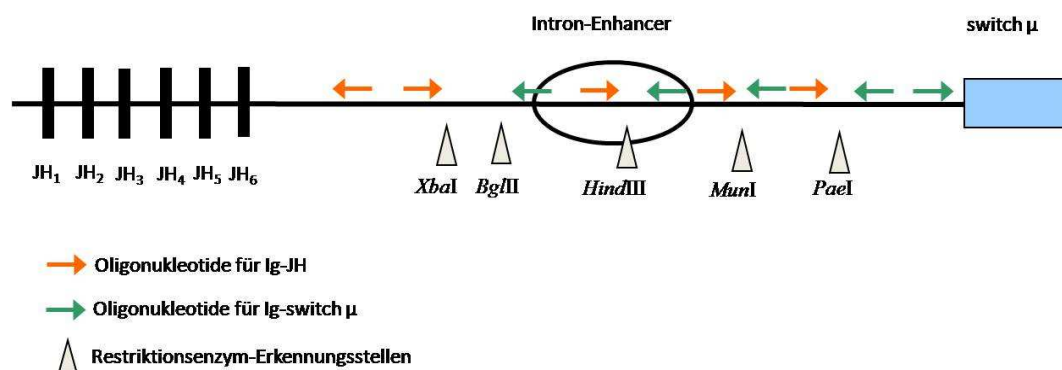


Abbildung 3: Schematische Darstellung der untersuchten Regionen der IgH-JH und IgH-Switch µ-LDI-PCR. Dargestellt ist die IgH-Region in der Keimbahn-Konfiguration. Die Restriktionserkennungsstellen finden sich nur einmal in diesem Bereich. Im Falle einer Translokation entsteht eine weitere Restriktionserkennungsstelle, dies kann aber auch durch die V(D)J-Umlagerung bzw. aufgrund eines Klassenwechsels auftreten.

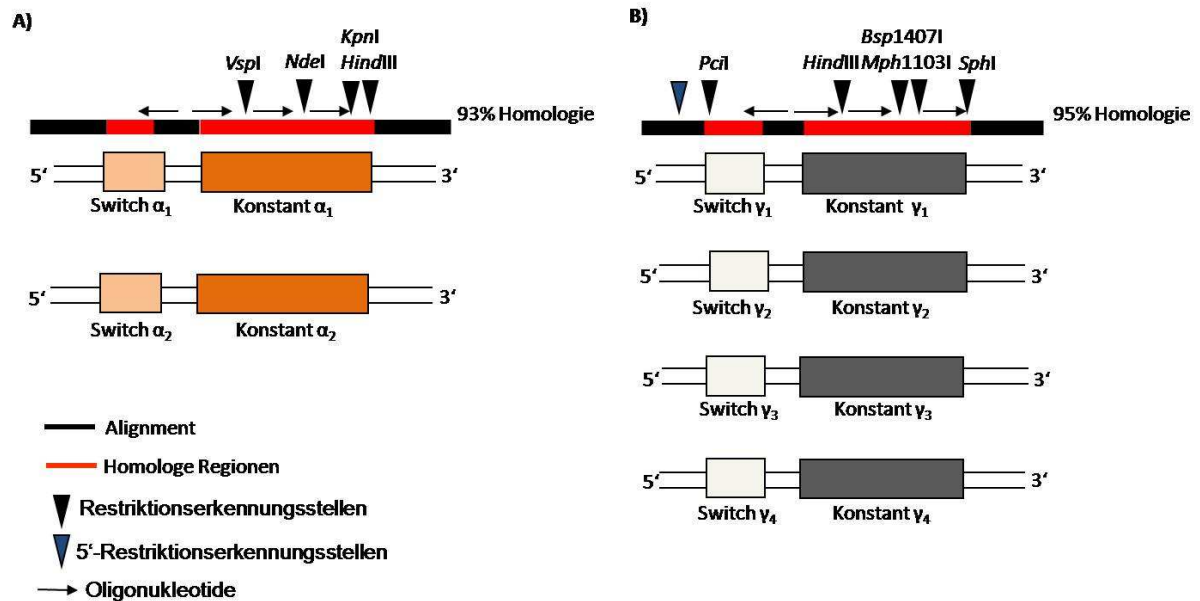


Abbildung 4: Schematische Darstellung der untersuchten Bereiche der IgH-Switch α und IgH-Switch γ -LDI-PCR. A) Schematische Darstellung des Alignments der zwei Alpha Isotypen. Die Switch-Regionen, genauso wie die konstanten Gene der Alpha-Isotypen sind evolutionär konserviert und weisen eine 93%ige Homologie zueinander auf. In den homologen Regionen der konstanten Gene wurden Restriktionserkennungsstellen ausgewählt, die nur einmal in dieser Region vorkommen. B) Schematische Darstellung des Alignments aller vier Gamma Isotypen. Auch die Switch- und konstanten Regionen der vier Gamma-Isotypen sind stark konserviert. Sie sind zu 95% Homolog. Die in der homologen Region der konstanten Genen vorkommenden Restriktionserkennungsstellen finden sich ein weiteres Mal im 5'-Bereich vor den Switch Regionen; dies kann in der Keimbahnkonfiguration zu unerwünschten Nebenprodukten in der PCR führen. Um dies auszuschließen, wurde eine weitere Restriktion mit *PciI* durchgeführt.

2.1.4 Long Distance-(LD)-PCR

Um die Translokationen zu bestätigen, den reziproken Part zu amplifizieren und die Sequenzlesbarkeit teilweise zu verlängern, wurden direkte, bruchpunktüberspannende LD-PCRs durchgeführt. Dazu wurden sequenzspezifische Primer des translozierten Chromosoms und ein entsprechender Zweitrunden-Primer des betroffenen IGH- oder MYC-Bereichs eingesetzt.

Die LD-PCRs wurden mit Hilfe der rTth Polymerase (*Applied Biosystems*) durchgeführt.

Ansatz der LD-PCR

0,6 µl dNTPs (je 2,5 mM)

9 µl 3,3 x rTth-Puffer

1 µl Mg(OAc)₂ (25 mM) (*Applied Biosystems*)

0,6 µl Forward Primer (10 µM)

0,6 µl Reverse Primer (10 µM)

6 µl Betain (5 M)

10,9 µl H₂O

1 µl 50 ng DNA

0,3 µl rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/µl) (*Applied Biosystems*)

PCR-Programm: 95°C 3:30 Min., 85°C Pause (Enzymzugabe), 45 Zyklen (95°C 45 Sek., 62°C 45 Sek., 68°C 8 Min.), 72°C 15 Min., 10°C Pause

Eine LD-PCR wurde unter gleichen PCR-Bedingungen mit TRAF3-sequenzspezifischen Primern durchgeführt, um den genauen Deletionsstart und das Deletionsende von TRAF3 in der Zelllinie UH-O1 zu bestimmen.

2.1.5 PCR zur Durchführung der Mutationsanalyse von TNFAIP3 und TRAF3

Für die Mutationsanalyse wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt, welche die kodierenden Exons der entsprechenden Gene flankieren. Die PCRs wurden in der ersten Runde als Multiplex PCR durchgeführt, bevor in der zweiten Runde die Exons einzeln amplifiziert wurden. Die Primer wurden *nested* oder *semi-nested* eingesetzt, bis auf TRAF3 Exon 6, das *ungenested* amplifiziert wurde. Bei einer PCR aus mikrodisssektierten Zellen wurden diese vorher mit 0,25 mg/ml Proteinase K (*Roche*) für 2 h bei 50°C, gefolgt von 5 Min. bei 95°C inkubiert.

Ansatz der Multiplex-PCR für TNFAIP3 und TRAF3:

	TNFAIP3	TRAF3
dNTPs (je 2 mM)	5 µl	5 µl
10 x Hifi-Puffer (<i>Roche</i>)	3 µl (HF3)	5 µl (HF2)
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl	3 µl
Forward Primer	0,625 µl (10 µM) E4/5, E7.2, E6, E8 oder E2, E3, E7.1, E9	0,5 µl (20 µM) E3, E4, E5, E6, E7 oder E8, E9, E10, E11, E12
Reverse Primer	0,625 µl (10 µM) E4/5, E7.2, E6, E8 oder E2, E3, E7.1, E9	0,5 µl (20 µM) E3, E4, E5, E6, E7 oder E8, E9, E10, E11, E12
Betain (5 M)	10 µl	10 µl
H ₂ O	0,5 µl	1,5 µl
gepickte Zellen oder 50 ng Zelllinien-DNA	20 µl	20 µl
High Fidelity-Polymerase (<i>Roche</i>)	0,5 µl	0,5 µl

PCR-Programm: 95°C 2:30 Min., 45 Zyklen (95°C 30 Sek., 61°C (TN FAIP3)/ 62°C (TRAF3) 30 Sek., 72°C 90 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

Die zweite PCR-Runde wurde mit identischen PCR-Bedingungen durchgeführt, um die entsprechenden Exons einzeln zu amplifizieren.

Eine PCR zur Durchführung der Mutationsanalyse von IMMP2L in MMML Fall #108 wurde unter gleichen PCR-Bedingungen durchgeführt. Die kodierenden Exons von IMMP2L wurden diesmal jedes einzeln für sich in einer *genesteten* oder *semi-genesteten* Zwei-Runden-PCR amplifiziert (außer Exon 2 und 3, die *ungenested* amplifiziert wurden).

2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren werden horizontale Agarosegele verwendet. Abhängig von der Größe der DNA und dem gewünschten Trennbereich werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen von 0,8 – 2 % verwendet. Es entstehen Gele mit verschiedenen Porengrößen, durch welche die negativ geladene Nukleinsäure nach Anlegen einer Spannung im Laufpuffer zum positiven Pol wandert. Die DNA wurde mit Gelladepuffer versetzt und in Vertiefungen der 1 x TAE-Puffer-Gele aufgetragen, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit UV Licht stark erhöht wird.

Durch gleichzeitiges Auftragen eines Größen- oder Mengenstandards können Größe und Konzentration der DNA bestimmt werden.

50 x TAE Puffer:	2 M Tris-Acetat
	50 mM EDTA, pH 8,0
	ad 1 l ddH ₂ O
10 x Gelladepuffer	50% (v/v) Glycerin
	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	0,25% (w/v) Xylencyanol FF

2.1.7 Elution von DNA aus Agrosegelen

Die DNA-Fragmente wurden mit dem QiaexII Gelelution Kit (*Qiagen*) oder mit dem InnuPREP DoublePure Kit (*Analytik Jena*) nach Herstellerangaben aus Agarosegelen eluiert.

2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

DNA-Fragmente wurden von Oligonukleotiden, Nukleotiden und Puffer mittels des InnuPREP DoublePure Kit (*Analytik Jena*) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.1.9 Sequenzreaktion und Auswertung

Um PCR-Produkte zu sequenzieren, wurde die entsprechende Menge an DNA (nach Herstellerangaben) mit 3 pmol des entsprechenden Oligonukleotids, 0,5 - 1 µl *Big Dye*-Lösung (*Applied Biosystems*) und 3,75 – 3,5 µl 5x *Sequencing Puffer* (*Applied Biosystems*) gemischt, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und eine Sequenzreaktion nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach der Ethanol-Fällung wurden die Sequenzen auf dem ABI-3130-Sequenzierautomaten von *Applied Biosystems* analysiert. Die Sequenzierungen wurden anschließend durch die Begutachtung der Sequenz-Elektropherogramme, Datenbankvergleiche mit der Genom-Datenbank an der Universität von Kalifornien, Santa Cruz (UCSC: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) und der Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologie Information (NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ausgewertet.

Im Falle der Sequenzierung für die TNFAIP3 und TRAF3 Mutationsanalysen wurden die Sequenzen neben der Begutachtung der Sequenz-Elektropherogramme zusätzlich mit der Sequenzanalyse-Software *Seqscape* (*Applied Biosystems*) untersucht. *Seqscape* erlaubt den Vergleich der ermittelten Sequenz mit einer Referenzsequenz, wodurch mögliche Varianten in der Sequenz erkannt werden und deren Konsequenz direkt auf der Polypeptidkette angegeben wird, sofern der kodierende Bereich der Sequenz vorher definiert wurde. Durch den komplementären Vergleich der Sequenzen beider Richtungen können zufällige Sequenzartefakte, wie sie durch Hintergrund-Rauschen entstehen, bewertet und herausgefiltert werden.

2.1.10 Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Enzym*	Puffer
<i>Bgl</i> II	O
<i>Bsp</i> 1407I	Tango
<i>Eco</i> RI	EcoRI
<i>Hind</i> III	HindIII
<i>Kpn</i> I	KpnI
<i>Mun</i> I	G
<i>Mph</i> 1103I	R
<i>Nco</i> I	Tango
<i>Nde</i> I	O
<i>Psc</i> I	Tango
<i>Vsp</i> I	O
<i>Xba</i> I	Tango

* alle Enzyme stammten von Fermentas

2.2 RNA-Arbeitstechniken

2.2.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde durch das Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Folgende Formel lag bei der Konzentrationsbestimmung zugrunde:

$$\text{RNA Konzentration} = \text{OD}^{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

2.2.2 Reverse Transkription

Zur Generierung von komplementärer cDNA aus Gesamt-RNA wurde das *Omniscript RT-Kit* oder das *Sensiscript RT-Kit* (*Qiagen*) verwendet. 1 - 3 μg Gesamt-RNA wurden mit 1 μM oligo-dT (*Qiagen*) oder 0,2 μM genspezifischen Oligonukleotiden, 1 mM dNTP, 40 Einheiten RNase-Inhibitor (*Promega*) und 4 Einheiten Reverse Transkriptase (*Qiagen*) in vom Hersteller empfohlenen Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 μl 60 Min. bei 37°C inkubiert.

2.2.3 5'-RACE

Ausgehend von einer kurzen bekannten Sequenz in der kodierenden Region eines Transkripts kann das unbekannte 5'-Ende der mRNA untersucht werden. Dafür wird an das 5'-Ende der mRNA ein Adapter ligiert. Voraussetzung für die RACE ist eine cDNA-Synthese und Amplifikation der cDNA Fragmente mittels PCR. Bei der 5'-RACE startet die cDNA-Synthese mit einem, von der bekannten Sequenz abgeleiteten, Primer, der in Gegensinn-Richtung (*antisense*) im kodierenden Bereich der zu untersuchenden mRNA bindet (Frohman, 1994). Daraufhin wird mit einer terminalen Nukleotidyltransferase (*Roche*) und dATP (*Roche*) ein eigenes poly(A)-Ende an das cDNA-Molekül angehängt. Die cDNA-Synthese und das poly(A)-tailing wurden nach Protokoll des 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (*Roche*) durchgeführt. Das entstandene Produkt dient als Vorlage einer PCR-Reaktion. Hierbei werden der sequenzinterne Primer und zwei *sense* Primer verwendet. Der erste *sense*-Primer besteht aus einer oligo(dT)- und *Anker*-Sequenz (*Roche*), der zweite nur aus der *Anker*-Sequenz (*Roche*). Mit Hilfe des ersten Primers wird der Anker an die PCR-Produkte angefügt, der zweite sorgt für eine spezifische Amplifikation während der PCR. Die PCR wurde nach Angaben des 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (*Roche*) durchgeführt. Das amplifizierte Produkt kann anschließend sequenziert werden.

2.3 Herstellung von Gewebeschnitten

Von den Lymphknotenbiopsaten (Gefriermaterial) wurden 5 - 7 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und 24 h an der Luft getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -20°C e eingefroren.

2.4 Immunfärbung von Gewebeschnitten

5 - 7 µm dicke Gewebe-Gefrierschnitte wurden aufgetaut und 4 h auf einem Heizblock bei 37°C getrocknet. Die Schnitte wurden dann 10 Min. Aceton-fixiert und anschließend 30 Min. vollständig getrocknet. Die Antikörper wurden in 1 x TBS-Puffer (1% BSA) verdünnt. Der Primärantikörper wurde aufgetragen und 45 Min. in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x TBS (jeweils 5 Min.) wurden die Schnitte 30 min mit dem Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte für jeweils 5 Min. und eine 30 minütige Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (*StreptABComplex*, *DAKO*). Nach erneutem dreimaligem Waschen (jeweils 5 Min.)

wurde das *Fast Red-Substrat* zugeben. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Waschen in Wasser gestoppt. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Meyer.

2.5 Mikrodissektion mittels Laser Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapulting (LPC)

Die Mikromanipulation wurde mit dem *PALM[®] Robot-MicroBeam* (*PALM*, Bernried) mit dazu gehörigem Axiovert 200 Mikroskop (*Zeiss*, Jena) im Institut für Pathologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/M durchgeführt.

Die Gewebeschnitte wurden nach dem Färben für 2 - 3 h bei Raumtemperatur getrocknet. Für Einzelzell-PCR-Untersuchungen wurden 0,5 ml Reaktionsgefäße mit steril filtrierter 1%iger BSA-TBS-Lösung für 30 Min. inkubiert, um unspezifische Bindungen am Plastik zu verhindern. In die Deckel der LPC-Mikrozentrifugenröhrchen (*PALM*) wurden 20 µl 1 x *High Fidelity Puffer* (*Roche*) vorgelegt. Die Deckel wurden in die entsprechende Halterung am *PALM[®] Robot-MicroBeam* eingesetzt und auf die korrekte Position eingestellt. Die gewünschten Zellen wurden bei 400facher Vergrößerung am Bildschirm des Computers mit Hilfe der Maus umrandet und somit markiert. Die Zellen wurden dann automatisch durch die Software mittels Laser ausgeschnitten und in den Deckel des Reaktionsgefäßes katapultiert. Das Katapultieren erfolgte durch einen Laser-Impuls unterhalb des eingestellten Fokus auf eine schmale Gewebebrücke, die zwischen der Zelle und ihrer Umgebung nach dem Ausschneiden der Zelle verblieb. Nach erfolgter LPC wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig aus der Halterung entfernt, der Deckel geschlossen und die sich im Deckel befindlichen Zellen für 2 Min. bei 15.000 x g in das Reaktionsgefäß zentrifugiert. Die Zellen wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.6 Arbeiten mit Zellen

2.6.1 Zellkultur

Zelllinie	Ursprung	Literatur
L-1236	HL peripheres Blut	(Wolf et al., 1996)
L-428	HL Pleural-Erguss	(Drexler, 1993)
DEV	NLPHL Pleural-Erguss	(Poppema et al., 1985; Maggio et al., 2002)
HDLM2	HL Pleural-Erguss	(Drexler, 1993)
KM-H2	HL Pleural-Erguss	(Drexler, 1993)
SUP-HD1	HL Pleural-Erguss	(Naumovski et al., 1989)
U-HO1	HL Pleural-Erguss	(Mader et al., 2007)
Raji	BL	(Pulvertaft, 1964)
BL-41	BL	(Lenoir et al., 1985; Cohen et al., 1987)

2.6.2 Kultivierung von Zellen

Die Suspensionszellen wurden in RPMI1640 versetzt mit Glutamax-1 (PAA), 20% FCS (PAA) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g und 4°C gesammelt. Je nach Zelllinie und Zelldichte wurde im Durchschnitt alle zwei Tage eine entsprechende Menge Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden in einer 37°C und 5% CO₂-Athmosphäre in Kultur gehalten.

2.6.3 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wurde durch Auszählen entsprechender Verdünnungen von Zellsuspensionen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen vitalen und schadhaften Zellen wurde das gleiche Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung zugegeben.

2.7 Verwendete Oligonukleotide

IgH-LDI-PCR

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
S α ext rev	ATTCGTGTAGTGCTTCACGTGGCATG	LDI-PCR Switch α -Bereich 1. Runde
S α int rev	GTTTCTGAACATGCTCCTTAGATAGGG	LDI-PCR Switch α -Bereich 2. Runde
S α Vsp 1rd	GGATGGAGGATGGAAGATAGATGGAG	LDI-PCR Switch α -Bereich 1. Runde
S α Vsp 2rd	ATGGATGGATGGATAGATGGAAGAAGG	LDI-PCR Switch α -Bereich 2. Runde
S α Nde 1rd	TTACTGATGGAGGGGTGGATATACGG	LDI-PCR Switch α -Bereich 1. Runde
S α Nde 2rd	AGGATAGAAAGACAGGTGAATGACTGG	LDI-PCR Switch α -Bereich 2. Runde
S α Hind/Kpn 1rd	TGAGACCCTGAGGAAAATGAGGATGC	LDI-PCR Switch α -Bereich 1. Runde
S α Hind/Kpn 2rd	TCAACCTTTGGCACACTGAGTGTCTAG	LDI-PCR Switch α -Bereich 2. Runde
S γ ext rev	TTGACCACTGGACACTGTTCTCAGATG	LDI-PCR Switch γ -Bereich 1. Runde
S γ int rev	AGGCCCTTTTCTTCTGTGCAGCAGAG	LDI-PCR Switch γ -Bereich 2. Runde
S γ Hind 1rd	ATAAAAGGCTGGAGTGGGGCCAATGG	LDI-PCR Switch γ -Bereich 1. Runde
S γ Hind 2rd	ATGGCCAGAGCTGAGGCCAAGCTAGAG	LDI-PCR Switch γ -Bereich 2. Runde
S γ Pae 1rd	CCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGC	LDI-PCR Switch γ -Bereich 1. Runde
S γ Pae 2rd	CCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCC	LDI-PCR Switch γ -Bereich 2. Runde
S γ Mph/Bsp 1rd	TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC	LDI-PCR Switch γ -Bereich 1. Runde
S γ Mph/Bsp 2rd	GGCAAGGAGTACAAAGTGAAGGTCTC	LDI-PCR Switch γ -Bereich 2. Runde
upsmu II int for	AATGAGATGGCTTTAGCTGAGACAAGC	LDI-PCR Switch μ -Bereich 1. Runde
upsmu II ex for	TCCATCCAGCTTTCAGAAATGGACTC	LDI-PCR Switch μ -Bereich 2. Runde
upsmu Hind int rev	ACATAAATGAGTCTCCTGCTCTTCATCAAG	LDI-PCR Switch μ -Bereich 1. Runde
upsmu Hind ex rev	GCAATTAAGACCAGTTCCCTTCTAGTG	LDI-PCR Switch μ -Bereich 2. Runde
upsmu Mun/Bgl int rev	GGTCAGCCTCGCCTTATTTTAGAAACG	LDI-PCR Switch μ -Bereich 1. Runde
Upsmu Mun/Bgl ex rev	TCCAGGTGTTGTTTTGCTCAGTAGAG	LDI-PCR Switch μ -Bereich 2. Runde
upsmu Pae int rev	CTCAATTCCAGACACATATCACTCATGG	LDI-PCR Switch μ -Bereich 1. Runde
upsmu Pae ex rev	CTCAGAAGCCACTTCAAACATATCCTG	LDI-PCR Switch μ -Bereich 2. Runde
J6 II ex rev	TGCAATGCTCAGGAAACCCACAGG	LDI-PCR JH-Bereich 1. Runde
J6 II int rev	TAGCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGTG	LDI-PCR JH-Bereich 2. Runde
JH Hind ex for	TGGGATGCGTGGCTTCTGCT	LDI-PCR JH-Bereich 1. Runde
JH Hind int for	GCCCTTGTTAATGGACTTGGAGGA	LDI-PCR JH-Bereich 2. Runde
JH Mun ex for	GCTCAGCTAAGAAATACTAGCACAGTG	LDI-PCR JH-Bereich 1. Runde
JH Mun int for	GCTGGAAGCAGATGATGAATTAGAGTC	LDI-PCR JH-Bereich 2. Runde
JH Pae ex for	CTTTAGAATTATGAGGTGCGCTGTGTG	LDI-PCR JH-Bereich 1. Runde
JH Pae int for	AGAGAACTGTCGGAGTGGGTGAATC	LDI-PCR JH-Bereich 2. Runde
JH Xba ex for	CCTTGCTAAGTCATTGACTGTAGGTC	LDI-PCR JH-Bereich 1. Runde
JH Xba int for	ACCCTTGAAAGTAGCCCATGCCTTC	LDI-PCR JH-Bereich 2. Runde

MYC-LDI-PCR

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
U- Myc ex rev	GCTGCCAATGAAAATGGGAAAGGTATC	LDI-PCR Upstream-Bereich 1. Runde
U-Myc int rev	TCGCAGATGAAACTCTGGTTCACCATG	LDI-PCR Upstream-Bereich 2. Runde
U-Bsp 1 st rd	TAACCCAGCTGTCTTTCCCTTTATGAG	LDI-PCR Upstream-Bereich 1. Runde
U-Bsp 2 nd rd	GCTCTTTGGGGAGATAATTTTGTCCAG	LDI-PCR Upstream-Bereich 2. Runde
U-Mun-Eco-Nco 1 st rd	ATGTTTTGTTTCGTTTCTTCCCCCTCC	LDI-PCR Upstream-Bereich 1. Runde
U-Mun-Eco-Nco 2 nd rd	CAACCACCACCATCCCTGTTTGTTTTC	LDI-PCR Upstream-Bereich 2. Runde
D-Myc ex for	ATGCCTTGTTTCATCTGGGTCTAATGTG	LDI-PCR Downstream-Bereich 1. Runde
D-Myc int for	TCTATTTGTGTCCCAAGCACTCCTAAGC	LDI-PCR Downstream-Bereich 2. Runde
D-Bsp 1 st rd	TCTGACACTGTCCAACCTTGACCCTCTTG	LDI-PCR Downstream-Bereich 1. Runde
D-Bsp 2 nd rd	AGAAGGTGATCCAGACTCTGACCTTTTG	LDI-PCR Downstream-Bereich 2. Runde
D-Mun-Eco-Nco 1 st rd	TGCTGCTTTGTATTATCTGCGTGGCTAC	LDI-PCR Downstream-Bereich 1. Runde
D-Mun-Eco-Nco 2 nd rd	TAGTAGCATTCTCCAGAGATCCTCTG	LDI-PCR Downstream-Bereich 2. Runde

LD-PCR

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
IMMP2L rev	GATGGACAAGGCACTTCATAATTGGTG	Bestätigung der Translokation mit IGH
BCAS2 rev	CAATGTAGCACTTGCCCCCATATTGC	Bestätigung der Translokation mit IGH
PVRL2 rev	GAGCGAAGGAGACAGAATTCTTTG	Bestätigung der Translokation mit IGH
EXOC2 rev	TGTACGCTCCGTCGGTCATCATCTTG	Bestätigung der Translokation mit IGH
Myc-Ex1 rev	AGACACCCTATTTAGGCATTTCGAC	Bestätigung der Translokation mit MYC
Chr.16 forw	TTCACTGGGCTCCAATTTGATGTCGTC	Bestätigung der Translokation mit MYC
Chr.7D rev	GAAGCAGCTGATAATGTCCGTCCAG	Verlängerung der Sequenz von IMMP2L
Chr.1-7 forw	GTGCTAGGTGCCATTCTAGATTCTGAG	Verl. der Sequenz von BCAS2 (upstream)
Chr.1-6 rev	AGAAAAACAGTAACCGCCTCCTGAGG	Verl. der Sequenz von BCAS2 (downstream)
Myc-Ex1-7-forw	CTTTGCACTGGAACCTTACAACACC	Amplifikation der reziproken Translokation
SOCS-4-rev	CACAGCAGAAAAATAAGCCAGAG	Amplifikation der reziproken Translokation

TRAF3 Mutationsanalyse

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
TRAF3-Exon3-1F	GTTGGGAAGGATTCTTGTGTTGCC	1. Runde Exon 3
TRAF3-Exon3-1R	GCCTCAGTAAACCCACACGTGG	2. Runde Exon 3
TRAF3-Exon3-F	CAGGTCTCAGGCACTTTTGCTTTCCC	1. Runde Exon 3
TRAF3-Exon3-R	GATTCACAAGCTGGGCCCGGAG	2. Runde Exon 3
TRAF3-Exon4-1F	CCTGAAGCTCTGCTGGTTGCTG	1. Runde Exon 4
TRAF3-Exon4-1R	GCCGCATCAGCTGCCAAACTG	1. Runde Exon 4
TRAF3-Exon4-F	GAGCCACTGTGCAGACCTGACC	2. Runde Exon 4
TRAF3-Exon4-R	GTGTTGTGCCAGAGTGCCGAATGC	2. Runde Exon 4
TRAF3-Exon5-1F	GGGCAGCTTCTTCATTCTACTTCTAG	1. Runde Exon 5
TRAF3-Exon5-1R	TACTCAAGTGTTCTGACTGCTTTCC	1. Runde Exon 5
TRAF3-Exon5-F	TGCCTTGTCCAAAGTAGCAGCATGTGG	2. Runde Exon 5
TRAF3-Exon5-R	GTGCCACATCCTACTGACCACTTCATC	2. Runde Exon 5
TRAF3-Exon6-F 1neu	TTTTTCCCAATTAAGAACATTGAATGGTC	1./2. Runde Exon 6
TRAF3-Exon6-R	AGGAATTGAGTGGAAGGCCTGTG	1./2. Runde Exon 6
TRAF3-Exon7-1F	CGATGGTGAGCAGAGCCATTC	1. Runde Exon 7
TRAF3-Exon7-1R	ACTCTCACGAAGTGGGAAAACGTG	1. Runde Exon 7
TRAF3-Exon7-F	TGGGGATCTCAGCGGGACTGAAG	2. Runde Exon 7
TRAF3-Exon7-R	TATGCAGGGAAGGGGAGCCAGG	2. Runde Exon 7
TRAF3-Exon8-1F	CCTGCCATCAATTAGAGTTGACAG	1. Runde Exon 8
TRAF3-Exon8-1R	TCACCCATGCAACAGGGTG	1. Runde Exon 8
TRAF3-Exon8-F	ACCTGAGTTTCTGGCCCTTACAGAGG	2. Runde Exon 8
TRAF3-Exon8-R	TGGCAGAATGTCACTGACTGGGAAGG	2. Runde Exon 8
TRAF3-Exon9-1F	TAGGGTCGTATGTTAGCCGTTCTGC	1. Runde Exon 9
TRAF3-Exon9-1R	GAGTGAGTAAGGATGGCTGTCTTCC	1. Runde Exon 9
TRAF3-Exon9-F	GCGAGGTTGCTGAATGCCTCAC	2. Runde Exon 9
TRAF3-Exon9-R	AAACAGCAGGGTGGGGACTGGG	2. Runde Exon 9
TRAF3-Exon10-1F	CAAGAGGCTGAAGTGGGAGGATC	1. Runde Exon 10
TRAF3-Exon10-1R	TTGCAAAGGTCAAGGACTCAGCTC	1. Runde Exon 10
TRAF3-Exon10-F	TGAGCCCAGGAGGTCAAGGCTG	2. Runde Exon 10
TRAF3-Exon10-R	AGGGGAACACAGGCAAGCTCCTC	2. Runde Exon 10
TRAF3-Exon11-1F	CTGACTGTTCTGCTCCTAGCCTGTC	1. Runde Exon 11
TRAF3-Exon11-1R	GTACCTAACATAGCCCTCATCCCAC	1. Runde Exon 11
TRAF3-Exon11-F	GGTGGTGCAGCATTTTCCGAGTCC	2. Runde Exon 11
TRAF3-Exon11-R	CCCAGATGCACACTGCTGGC	2. Runde Exon 11
TRAF3-Exon12-1F	CACCTCTAATCCCAGCTGCTCAGG	1. Runde Exon 12
TRAF3-Exon12-1R	CCTCAGTGAAGACAGACCGGTTT	1. Runde Exon 12
TRAF3-Exon12-F	ACGAGTGCTGGTGCAGCTTTGC	2. Runde Exon 12
TRAF3-Exon12-R	CCCCAGAGGAGTTGCCTTCTGC	2. Runde Exon 12

Long Distance PCR für die TRAF3 Deletion in der UHO-1 Zelllinie

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
TRAF3-Upstr-8-F	AGTGGCACCTCTCACACCTTCATTTG	Amplifikation
TRAF3-Downstr-3-R	GAAGCTGCCCCTGAGTGACTTGCTTC	Amplifikation
TRAF3-Upstr-7bS-F	ATGTCTCACATGGCAGCAGGCAAGAG	Sequenzierung
TRAF3-Downstr-2aS-R	ACACTGCAGGTGCCATGTGTGCACAG	Sequenzierung

TNFAIP3 Mutationsanalyse

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
A20E2exF	TGCCTACAGATCAGGGTAATGACAAG	1. Runde Exon 2
A20E2intF	GTTTCCTGCAGGCAGCTATAGAGG	2. Runde Exon 2
A20E2R	AGCTTCATGAATGGGGATCCAGCAG	1./2. Runde Exon 2
A20E3exF	ACCATTTCAGTCCCCTAGAAATAGCAG	1. Runde Exon 3
A20E3intF	ACCTTTTGCTGGGTCTTACATGCAG	2. Runde Exon 3
A20E3R	TATGCCCAACCATGGAGCTCTGTTAG	1./2. Runde Exon 3
A20E4-5exF	TGAATAATTGTAGAGTGATGTCAGAATGAC	1. Runde Exon 4/5
A20E4-5intF	TACAGGGAGTACAGGATACATTCAAGC	2. Runde Exon 4/5
A20E4-5R	GGAAAACCCTGATGTTTCAGTGTCTAG	1./2. Runde Exon 4/5
A20E6exR	AATCACTCTACTGTTGAGCTTCAGG	1. Runde Exon 6
A20E6F	TGAGATCTACTTACCTATGGCCTTG	1./2. Runde Exon 6
A20E6intR	TCAGGTGGCTGAGGTTAAAGACAG	2. Runde Exon 6
A20E7.1exF	GGTTCTACAATTCTTGCCATAATCCAC	1. Runde Exon 7
A20E7.1intF	GAGCTAATGATGTAAAATCTTGTGTGTG	2. Runde Exon 7
A20E7.1R	CAAAATCCGTTGTGCTGCACATTCAG	1./2. Runde Exon 7
A20E7.2exR	CAGTTCTGCCTGACTGCCTACATG	1. Runde Exon 7
A20E7.2F	CTCTCGGGGAGAAGCCTATGAGC	1./2. Runde Exon 7
A20E7.2intR	GAACAAAACCCCTTCTGGACAGCAG	2. Runde Exon 7
A20E8exR	ATGAGGAGACAGAACCTGGCAGAG	1. Runde Exon 8
A20E8F	ACTGTCAGCATCTCTGTATCGGTG	1./2. Runde Exon 8
A20E8intR	TGTCAGTGTGGTAGAAAACGCTC	2. Runde Exon 8
A20E9exF	GTAGACTCCACACTCTCCAATGAG	1. Runde Exon 9
A20E9intF	GTGCTCTCCCTAAGAAATGTGAGC	2. Runde Exon 9
A20E9R	GGGTTACCAAACCTGAGCATCGTGC	1./2. Runde Exon 9
A20E9RS	TGTTGCAGTGGCAGCTGAGGGGTTT	Sequenzierung Exon 9

IMMP2L Mutationsanalyse

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
IMMP2L Ex2 for	AAGATTGCCCTTCGGTAACTC	1. Runde Exon 2 forward
IMMP2L Ex2 rev	ACCTTTCAGTTCCCAGAATAG	2. Runde Exon 2 reverse
IMMP2L Ex3 for	TGAAGTGCAAGAACCATGAAG	1. Runde Exon 3 forward
IMMP2L Ex3 rev	GTGGATTACCAGTTAAATCAGC	2. Runde Exon 3 reverse
IMMP2L Ex4 for	GTGCAAAGGAATCTGTAAAGAC	1./2. Runde Exon 4 forward
IMMP2L Ex4 rev ext.	TACCAGCTCATTTGGAATGTC	1. Runde Exon 4 reverse
IMMP2L Ex4 rev	CCCAAGTAATGTAGGTAACAG	2. Runde Exon 4 reverse
IMMP2L Ex5 for ext	AATTATGGAGAAGCTTCATGG	1. Runde Exon 5 forward
IMMP2L Ex5 for	GTTTGTATGCCCAGCAGTTTG	2. Runde Exon 5 forward
IMMP2L Ex5 rev ext	ATACACACTCTGATAGTGATC	1. Runde Exon 5 reverse
IMMP2L Ex5 rev	GGCTGAGTTACCTGAATAACC	2. Runde Exon 5 reverse
IMMP2L Ex6 for ext	ATGGCTACAAAAGGTGTTTAC	1. Runde Exon 6 forward
IMMP2L Ex6 for	TTCTCCCTGGGATGTTAAACC	2. Runde Exon 6 forward
IMMP2L Ex6 rev ext	TAAGAAAGGCTTGAAGTGTATG	1. Runde Exon 6 reverse
IMMP2L Ex6 rev	ACAGAATGGGTTCTCCATTAC	2. Runde Exon 6 reverse

PVRL2 5'-Race

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
PVRL2-P1	TGTGTCTTGCCCAGTGCTCTGCTTG	cDNA-Synthese
PVRL2-P2	TGTACAGTCCAGGAACAGGTGGCAG	5'RACE 1. Runde
PVRL2-P4	TCGGGTAGCACTTGAAGTCTGCACATC	5'RACE 2. Runde

3. Ergebnisse

Im vorliegenden Ergebnisteil werden zuerst die Mutationsanalysen zweier negativer Regulatoren im NF- κ B-Signalweg, dem TNFAIP3-Gens in cHL und dem TRAF3-Gen in CLL, vorgestellt, bevor Translokationsereignisse mit bislang unbekannten Partnergenen des MYC- und des Ig-Locus beschrieben werden.

3.1 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens TNFAIP3 (A20) in CLL

Bei der CLL zeigen verschiedene Signalwege eine konstitutive Ausprägung und spielen dabei wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Krankheit (Cuni et al., 2004; Rosati et al., 2009). Einer dieser konstitutiv ausgeprägten Signalwege in CLL-Zellen ist der NF- κ B-Signalweg (Furman et al., 2000; Cuni et al., 2004; Hewamana et al., 2008). Da CLL-Zellen in engem Kontakt mit CD40-Ligand positiven T-Helferzellen stehen, kann die Einwirkung von CD40 auf die CLL-Zellen zu dieser Aktivierung beitragen (Furman et al., 2000). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Mikroumgebung in den Proliferationszentren für die starke NF- κ B-Aktivität der CLL-Zellen verantwortlich ist (Herreros et al.). Da aber auch Blut-CLL-Zellen eine schwache NF- κ B-Aktivität im Vergleich zu normalen B-Zellen zeigen (Furman et al., 2000), ist eine Beteiligung von genetischen Läsionen für die Aktivierung von NF- κ B Transkriptionsfaktoren nicht ausgeschlossen.

In diesem Zusammenhang wurden in A20, einem von TNFAIP3 kodierten Inhibitor des NF- κ B-Signalweges, inaktivierende Mutationen und/oder Deletionen in primären mediastinalen B-Zell Lymphomen, in einem Teil der Diffus Großzelligen B-Zell Lymphomen, MALT-Lymphomen und im klassischen Hodgkin Lymphom gefunden (Compagno et al., 2009; Honma et al., 2009; Kato et al., 2009; Novak et al., 2009; Schmitz et al., 2009a; Chanudet et al.). Alle diese Lymphome zeigen eine konstitutive Ausprägung von NF- κ B und der Verlust von A20 führt zu einem verbesserten Überleben der Lymphomzellen (Compagno et al., 2009; Honma et al., 2009; Kato et al., 2009; Schmitz et al., 2009a). A20 ist ein ubiquitin-modifizierendes Enzym, welches eine wichtige Rolle bei der Inhibierung von TNF- und Toll-ähnliche Rezeptor vermittelter NF- κ B-Aktivierung spielt. Die Aktivierung des IKK-Komplexes nach einer TNF-Rezeptor-Stimulation erfordert die Polyubiquitinierung des Rezeptor-interagierenden Faktors RIP1 an Lysin 63-Resten (K63) (Ea et al., 2006; Wu et al.,

2006). Die Kinase- γ (NEMO), eine regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, bindet spezifisch die Proteinmodifikation von RIP1 und aktiviert den IKK-Komplex. A20 führt zur Degradierung des RIP1-Proteins durch das Proteasom indem es die K63-Polyubiquitinkette entfernt und an A20 Lysin 48-gekoppelte (K48) Polyubiquitinketten anhängt (Wertz et al., 2004). Dadurch zeigt sich die Bedeutung von TNFAIP3 als Tumorsuppressor Gen in verschiedenen Typen von humanen B-Zell Lymphomen. Da in CLL nicht nur eine konstitutive NF- κ B-Aktivität gefunden wurde, sondern die Tumorzellen auch eine rekurrente Deletion in Chromosom 6q23, dem Lokalisationsort von TNFAIP3, aufweisen (Stilgenbauer et al., 1999; Fink et al., 2005), schien es von großem Interesse, nach inaktivierenden Mutationen, die A20 betreffen, in primären CLL-Fällen zu suchen.

Aus früheren CLL-Studien wurden 48 primäre CLL-Fälle ausgewählt, in denen durch FISH-, Array-CGH- oder SNP-Chip-Analysen (Genome-Wide Human SNP Array 500K und 6.0 Affymetrix®) eine Chromosom 6q Deletion identifiziert werden konnte (Stilgenbauer et al., 1999; Schwaenen et al., 2004). Diese Vorselektion sollte die Chance erhöhen, TNFAIP3-Mutationen zu finden, da vorherige Studien zu A20-Mutationsanalysen in anderen B-Zell Lymphomen zeigen konnten, dass viele der mutierten Fälle eine Kombination von Deletionen auf einem Allel und Mutationen oder kleinere Deletionen auf dem anderen Allel aufwiesen (Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009; Schmitz et al., 2009a).

Entsprechend der Unterscheidung der CLL in zwei Gruppen anhand ihres IgV Mutationsstatus, waren auch unter den ausgewählten 48 CLL Fälle mit mutierten IgV-Genen und unmutierten IgV-Genen vertreten (Tabelle 1).

Mit den Array-CGH und SNP-Chip-Analysen konnten Deletionen im TNFAIP3-Lokalisationsort 6q23 spezifisch identifiziert werden, jedoch sind die in den Studien verwendeten FISH-Proben sind in Chromosom 6q21 lokalisiert und detektierten deshalb nicht notwendigerweise eine Deletion in TNFAIP3 in 6q23. Da 6q21 Deletionen sich aber oft auch auf den Bereich von 6q23 erstrecken (Fink et al., 2005), wurden von den 48 Fällen auch 44 Fälle miteinbezogen, die mittels FISH-Analyse eine Chromosom 6q21 Deletion zeigten. Eine SNP-Chip und/oder Array-CGH Analyse von zwölf dieser Fälle zeigte dann auch tatsächlich eine Deletion in 6q23 (Tabelle 1). Die Anzahl der CLL-Zellen mit einer 6q Deletion reicht, nach Informationen unserer Kooperationspartner aus Ulm, von 4 – 93,5%; 15 Fälle davon besitzen die Deletion in mehr als 81% der Zellen. Von den zwölf Fällen mit der

bestätigten 6q23Deletion haben drei der Fälle in mehr als 81% der Zellen diese Deletion (Tabelle 1).

Aus den gewählten Fällen wurde in Zusammenarbeit mit einer Kooperationsgruppe genomische DNA isoliert und alle kodierenden Exons (Exon 2 – Exon 9) von TNFAIP3 in einer Von R. Schmitz etablierten und in der vorliegenden Arbeit für diese Analyse modifizierte Zwei-Runden PCR amplifiziert (Schmitz et al., 2009a). In der anschließenden Sequenzanalyse wurde nur ein Fall (Tabelle 1, Fall 27) mit einem Sequenzunterschied zur publizierten TNFAIP3-Sequenz identifiziert, und zwar ein heterozygoter Austausch in Exon 3 von G zu A (Abbildung 5) in Position 531 der mRNA aufwies (GenBank/EMBL/DDBJ Eintragsnummer NM_006290.2).

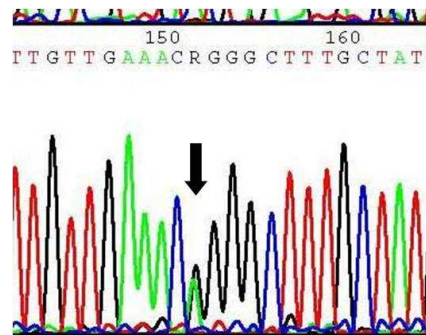


Abbildung 5: Heterozygote Mutation in B-CLL Fall 27. Dargestellt ist die in dem Sequenz-Elektropherogramm beobachtete stille Mutation. Der Pfeil zeigt den Basenpaaraustausch von G zu A an. Die Doppelspitze weist auf das Auftreten des Wildtyp-Allels neben dem mutierten Allel hin, wahrscheinlich verursacht von dem hohen Anteil an Tumorzellen ohne Deletion in Chromosom 6q.

Dieser Austausch ist eine stille Mutation und daher funktionell nicht relevant. Ob es sich hierbei um eine somatische Mutation oder um einen bislang noch nicht beschriebenen, seltenen Polymorphismus handelt, ist bislang unbekannt. Leider war keine Keimbahnsequenz verfügbar. Dass auch die Wildtyp-Sequenz von Exon 3 sichtbar ist, liegt wahrscheinlich daran, dass in Fall 27 nur ungefähr 20% der CLL-Zellen die Chromosom 6q Deletion auf dem anderen Allel besaßen. In Fall 9 konnte ein bekannter heterozygoter Polymorphismus beobachtet werden, auch hier lag der Anteil der Zellen mit einer Deletion nur bei ungefähr 15%. Alle anderen Fälle zeigten keine Mutationen oder andere bislang unbekannte Sequenzvarianten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Resultat der TNFAIP3 Mutationsanalyse.

Fall	IgV-Mutations-status	Durchschnittliche Anzahl der Zellen mit einer 6q21/6q23 Deletion (%)	del6q21 identifiziert durch FISH:	del6q23 identifiziert durch:	TNFAIP3 Mutation
1	unmutiert	17	+	n. A.	Neg.
2	unmutiert	29,5	+	-*	Neg.
3	unmutiert	28,5	+	n. A.	Neg.
4	mutiert	18,5	+	n. A.	Neg.
5	unmutiert	18	+	n. A.	Neg.
6	unmutiert	16	+	n. A.	Neg.
7	unmutiert	32	+	n. A.	Neg.
8	mutiert	39,5	+	SNP-Chip	Neg.
9	mutiert	15,2	+	n. A.	Neg.
10	mutiert	13,5	+	-*	Neg.
11	mutiert	20,5	+	n. A.	Neg.
12	unmutiert	49	+	n. A.	Neg.
13	unmutiert	31	+	SNP-Chip	Neg.
14	unmutiert	44	+	n. A.	Neg.
15	unmutiert	21	+	n. A.	Neg.
16	unmutiert	20	+	n. A.	Neg.
17	mutiert	25,5	+	-*	Neg.
18	mutiert	27,5	+	n. A.	Neg.
19	unmutiert	12	+	n. A.	Neg.
20	unmutiert	19	+	n. A.	Neg.
21	unmutiert	18,5	+	n. A.	Neg.
22	unmutiert	31,1	+	n. A.	Neg.
23	unmutiert	41,5	+	SNP-Chip	Neg.
24	unmutiert	16	+	n. A.	Neg.
25	mutiert	41	+	n. A.	Neg.
26	unmutiert	19	+	n. A.	Neg.
27	unmutiert	20,5	+	n. A.	Heterozygote stille Mutation
28	unmutiert	49,5	+	SNP-Chip	Neg.
29	k. A.	52	+	SNP-Chip	Neg.
30	k. A.	52	+	SNP-Chip	Neg.
31	unmutiert	n. A.	n. A.	SNP-Chip	Neg.
32	unmutiert	86	+	n. A.	Neg.
33	mutiert	89	+	n. A.	Neg.
34	k. A.	85	+	n. A.	Neg.
35	unmutiert	85	+	-*	Neg.
36	unmutiert	93,5	+	n. A.	Neg.
37	mutiert	94	+	n. A.	Neg.
38	unmutiert	86,5	+	n. A.	Neg.
39	mutiert	83	+	n. A.	Neg.
40	k. A..	86	+	n. A.	Neg.
41	unmutiert	82	+	SNP-Chip	Neg.
42	mutiert	85,5	+	n. A.	Neg.
43	k. A..	93,5	+	n. A.	Neg.
44	unmutiert	84	+	n. A.	Neg.
45	unmutiert	81,5	+	SNP-Chip	Neg.
46	unmutiert	89,5	n. A.	Array-CGH	Neg.
47	mutiert	39,5	n. A.	Array-CGH	Neg.
48	mutiert	4	n. A.	Arrax-CGH, SNP-Chip	Neg.

Alle kodierenden Exons des TNFAIP3-Gens wurden in 48 CLL-Fällen sequenziert.

k. A.: Keine Angaben; n. A.: Nicht analysiert. Neg.: Negativ. * In diesen Fällen wurden SNP-Chip-Analysen durchgeführt, aber keine 6q23 Deletion, die den TNFAIP3-Locus betraf, identifiziert.

3.2 Mutationsanalyse von TRAF3 im klassischen Hodgkin Lymphom

Die konstitutive Aktivität des NF- κ B-Signalweges ist ein besonderes Merkmal in den Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) –Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) (Bargou et al., 1996). NF- κ B-Signale sind wichtig für das Überleben der HRS-Zellen, werden sie inhibiert, so führt dies zum Zelltod in cHL-Zelllinien (Bargou et al., 1997). In früheren Studien wurden bereits mehrere Faktoren identifiziert, die zu der konstitutiven Ausprägung von NF- κ B beitragen, so exprimieren HRS-Zellen die Zelloberflächenrezeptoren CD30, CD40, RANK und BCMA aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) und in der Mikroumgebung der HRS-Zellen befinden sich Zellen, die Rezeptor-Liganden exprimieren (Küppers, 2009a). In den 40% der cHL-Fälle, die mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert sind, kann ein von EBV kodiertes Protein, das Latenz-Membranprotein 1 (LMP1), den aktivierten CD40-Rezeptor imitieren und so eine Aktivierung von NF- κ B herbeiführen (Kilger et al., 1998).

Es gibt aber auch mehrere genetische Läsionen, die eine Rolle in der Aktivität des NF- κ B-Signalweges spielen. So wurden inaktivierende Mutationen im Gen $I\kappa B\alpha$, das für einen negativen Regulator von NF- κ B kodiert, gefunden (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Jungnickel et al., 2000; Lake et al., 2009). Eine Studie zeigte Mutationen im $I\kappa B\epsilon$ -Gen (Emmerich et al., 2003), ebenso wie inaktivierende Mutationen im NF- κ B-Inhibitor A20 beschrieben wurden (Schmitz et al., 2009a). 30% der HRS-Zellen haben einen Zugewinn des REL-Gens (Joos et al., 2000; Martin-Subero et al., 2002). Weitere Zugewinne in NF- κ B-assoziierten Genen (wie NIK, CD40, $I\kappa B\beta$) wurden durch CGH-Analysen von mikrodisssektierten HRS-Zellen gefunden (Steidl et al.).

Aufgrund dieser Vielzahl an Komponenten, die zu einer NF- κ B Deregulierung führen können, war es von großem Interesse zu überprüfen, ob genetische Läsionen von TRAF3 ebenfalls einen Faktor der konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in cHL darstellen.

Das Gen für den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktor 3 (TRAF3) ist auf Chromosom 14q32 lokalisiert, eine Region, die eine der am häufigsten in chromosomale Aberrationen involvierte Bande des Genoms in cHL ist (Falzetti et al., 1999). Im alternativen NF- κ B-Signalweg werden IKK-Kinasen durch die Serin-Threonin-Proteinkinase NIK phosphoryliert und damit aktiviert (Matsushima et al.,

2001; Yin et al., 2001). Die IKK-Kinasen selbst phosphorylieren p100, das an RelB gebunden im Zytoplasma vorliegt. Dadurch wird p100 partiell zu p52 degradiert und gelangt als Dimer mit RelB in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken. TRAF3 wirkt als negativer Regulator von NIK und damit des alternativen NF- κ B-Signalweges (Liao et al., 2004). Unterstützt wird diese Aussage durch eine konstitutive Prozessierung von p100 zu p52 durch eine Akkumulation von NIK in TRAF3 defizienten Zellen (He et al., 2006a). TRAF3 hat wahrscheinlich aber auch eine inhibitorische Rolle im klassischen NF- κ B-Signalweg (Zarnegar et al., 2008). Inaktivierende Mutationen und Deletionen im TRAF3-Gen wurden bereits in der CLL, anderen niedrig-malignen Lymphomen und im Multiplen Myelom gefunden (Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2007; Nagel et al., 2009).

Für die TRAF3-Mutationsanalyse wurde eine Mikrodissektion von HRS-Zellen aus Gefrierschnitten von Lymphknotenbiopsaten aus 7 cHL-Fällen, die aus dem Kollektiv des Senkenberg-Instituts in Frankfurt/M stammen, durchgeführt. Die Zellen wurden als 10er-Zellen vereinigt oder als Einzelzellen gesammelt. Genomische DNA aus den mikrodissektierten Zellen, aus den cHL-Zelllinien L-428, HDLM-2, L-1236, KM-H2, SUP-HD1 und U-HO1, sowie aus der DEV-Zelllinie, die ursprünglich aus einem nodulär Lymphozyten-prädominanten HL (NLPHL) stammt, wurde analysiert. Die DEV-Zelllinie wurde miteinbezogen, da die Tumorzellen dieser HL-Untergruppe ebenfalls eine starke NF- κ B-Aktivität aufweisen (Brune et al., 2008).

Alle kodierenden Exons von TRAF3 (Exon 3 – Exon 12) wurden in einer, in dieser Arbeit etablierten, Zwei-Runden PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Fünf der Zelllinien waren unmutiert. In der Zelllinie KM-H2 wurde ein homozygoter Nukleotidaustausch von G zu A (Tabelle 2 und Abbildung 6) in Exon 12 in Position 128016 der mRNA (GenBank/EMBL/DDBJ Eintragsnummer NM_000014.8) festgestellt. Da keine Keimbahn-DNA für diese Zelllinie zu erhalten ist, konnte nicht geklärt werden, ob diese Mutation eine somatische Punktmutation, verbunden mit uniparentaler Disomie oder Verlust des zweiten Allels, darstellt oder aber ein seltener, unbekannter Polymorphismus ist. Da die Mutation jedoch zu einem stillen Nukleotidaustausch führt, hat sie keine funktionelle Konsequenz.

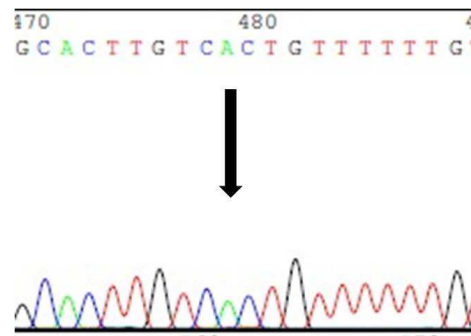


Abbildung 6: Homozygote Mutation in der HL-Zelllinie KM-H2. Dargestellt ist die in dem Sequenz-Elektropherogramm, beobachtete stille Mutation. Der Pfeil zeigt den Basenpaaraustausch von G zu A an. Das Fehlen einer Doppelspitze weist auf eine homozygote Mutation hin. Hierbei ist aber unklar, ob es sich um uniparentale Disomie oder das Fehlen des zweiten Allels handelt.

Bei der U-HO1-Zelllinie konnte kein einziges Amplifikat der analysierten Exons erhalten werden, was für eine bi-alleleische Deletion des TRAF3-Gens spricht. Eine SNP-Chip-Analyse unserer Kooperationspartner von dieser Zelllinie identifizierte tatsächlich eine große Deletion im Bereich des TRAF3-Locus. Durch eine direkte PCR mit verschiedenen Primerkombinationen war es möglich, ein 2,6 kb großes Amplifikat mit den Deletionsbruchpunkten zu erhalten. Die Sequenzanalyse dieses Amplifikationsproduktes zeigte eine 123371 bp große Deletion, beginnend im Intron 1 von TRAF3 bis zu einer Position 8163 bp stromabwärts des letzten kodierenden Exons von TRAF3 (Tabelle 2 und Abbildung 7).

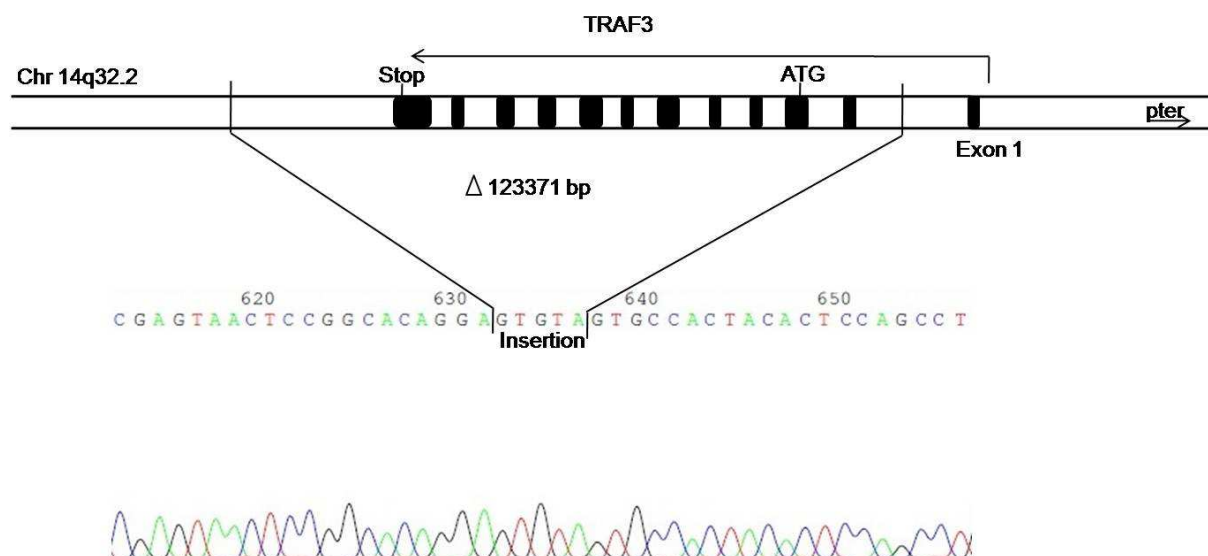


Abbildung 7: Schematische Darstellung und Elektropherogramm der TRAF3-Deletion in der HL-Zelllinie U-HO1. Dargestellt ist der TRAF3-Bereich auf Chromosom 14q32.2. Die Exons werden durch die schwarzen Rechtecke dargestellt, mit dem Start-ATG in Exon 3 und dem Stop-Kodon in Exon 12. Der Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung des Gens an. Die Deletion beginnt im Intron 1 und endet 8163 bp stromabwärts von Exon 12. Die Linien geben den Deletionsanfang und das Deletionsende an, auch bezogen auf das darunter befindliche Elektropherogramm, das die Basenabfolge vor und nach

den Deletionsbrüchen angibt. An den Deletionsbruchpunkten kam es zur Insertion von fünf nicht-keimbahnkodierten Basen. pter: Richtung zum p-Terminus von Chromosom 14.

Die Mutationsanalyse aus der 10er Zellsammlung der 7 mikrodisezierten cHL-Fälle ergab keine Mutation des TRAF3-Gens (Tabelle 2). In mehreren Zelllinien, sowie in einigen Primärfällen wurde ein bereits beschriebener Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) in Exon 5 von TRAF3 beobachtet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mutationsanalyse des TRAF3-Gens in HL-Zelllinien und mikrodisezierten HRS- Zellen.

Zelllinie/Fall	HL Untergruppe	Mutationen	SNPs ¹
<u>Zelllinie</u>			
L428	NS		
L1236	MC		Exon 5, heterozygot
KM-H2	MC	stille Mutation oder SNP in Exon 12 ²	
HDLM2	NS		Exon 5, homozygot
SUP-HD1	NS		
U-HO1	NS	123 kb Deletion, beginnend in Intron 1 ³	
DEV	NLPHL		Exon 5, homozygot
<u>Primärfälle</u>			
1 (1269)	MC		Exon 5, heterozygot
2 (1393)	MC		
3 (1701)	MC		Exon 5, heterozygot
4 (1716)	MC		
5 (1810)	NS		
6 (1817)	NS		
7 (1819)	NS		Exon 5, heterozygot

Die kodierenden Exons von TRAF3 wurden in 6 HL-Zelllinien und 7 Primärfällen sequenziert. SNP: Einzelnukleotidpolymorphismus, MC: Gemischtzellig, NS: Nodulär Sklerotisierend, NLPHL: nodulär Lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom.

¹Der SNP in Exon 5 ist ein T zu M Austausch in Kodon 129 an Position 98234 der Genbank Eintragung NC_000014.8.

²Die stille Mutation oder SNP in KM-H2 ist ein Serin zu Serin Austausch in Kodon 472 an Position 128016 der Genbank Eintragung NC_000014.8.

³Die Deletion in U-HO1 erstreckt sich von Position 103,257,420 bp vom p-Terminus zu 103,380,791 bp vom p-Terminus des Chromosom 14 (GRCh37/hg19).

3.3 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner des MYC-Proto-Onkogens in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL)

Der Transkriptionsfaktor MYC ist als einer der am häufigsten betroffenen Gene in einer Vielzahl von humanen Tumoren bekannt, und seine deregulierte Expression ist oft mit einer schlechten Prognose verbunden (Au et al., 2004). Das Burkitt Lymphom (BL) stellt das wichtigste Beispiel für MYC-induzierte Lymphomagenese dar. 1982 wurde demonstriert, dass in BL-Zellen der MYC-Locus auf Chromosom 8q24 mit der Immunglobulin-Schwerketten (IgH)-Region auf Chromosom 14 fusioniert war. Mit geringerer Häufigkeit kommt auch eine MYC-Translokation mit der Immunglobulin-Leichtketten-Region κ (Ig κ) auf Chromosom 2 oder der Immunglobulin-Leichtketten-Region λ (Ig λ) auf Chromosom 22 (Klapproth und Wirth) vor. Als Folge dieser Translokationen gelangt die kodierende Region von MYC unter die Kontrolle der Ig-Enhancer und MYC wird aberrant exprimiert.

Die Expression des MYC-Proto-Onkogens (c-Myc) ist eng verbunden mit der frühen G1-Phase des Zellzyklus und spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, bei der Differenzierung, dem Metabolismus und der Apoptose. Die Ig/MYC-Translokation ist die häufigste Form der genetischen Aberration von MYC, in einigen Fällen wurden aber auch MYC-Translokationen ohne Ig Beteiligung beschrieben (Levine et al., 1989; Rimokh et al., 1991; Knuutila et al., 1994; Au et al., 2004; Bertrand et al., 2007).

Im Rahmen des Verbundprojektes „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ (MMML) wurde ein großes Fallkollektiv mit über 900 reifzelligen, aggressiven B-NHL mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) auf MYC-Translokationen hin untersucht. Dabei konnten 13 Fälle identifiziert werden, die eine MYC-Translokation aufwiesen, bei denen der Ig-Locus als Partner ausgeschlossen werden konnte. Auch bereits bekannte Proto-Onkogene, wie PAX5, MALT1 und BCL6 wurden als Partner ausgeschlossen. Mit Hilfe der Langstrecken-Inversen-(LDI)-PCR sollte nun versucht werden, die MYC-Translokationsbruchpunkte zu klonieren und die beteiligten Gene zu identifizieren. Da schon durch andere Studien zu Ig/MYC- und Nicht-Ig/MYC-Translokationen bekannt war, dass die Bruchpunkte nicht in einer bestimmten MYC-Region vorkommen, sondern vor allem stromaufwärts des MYC-Gens, im Intron 1-Bereich und stromabwärts des MYC-Gens auftreten (Joos et al., 1992; Fabris et al., 2003; Au et al., 2004; Bertrand et al., 2007), wurden zwei verschiedene in dieser Arbeit etablierten Langstrecken-inverse-(LDI)-PCR-

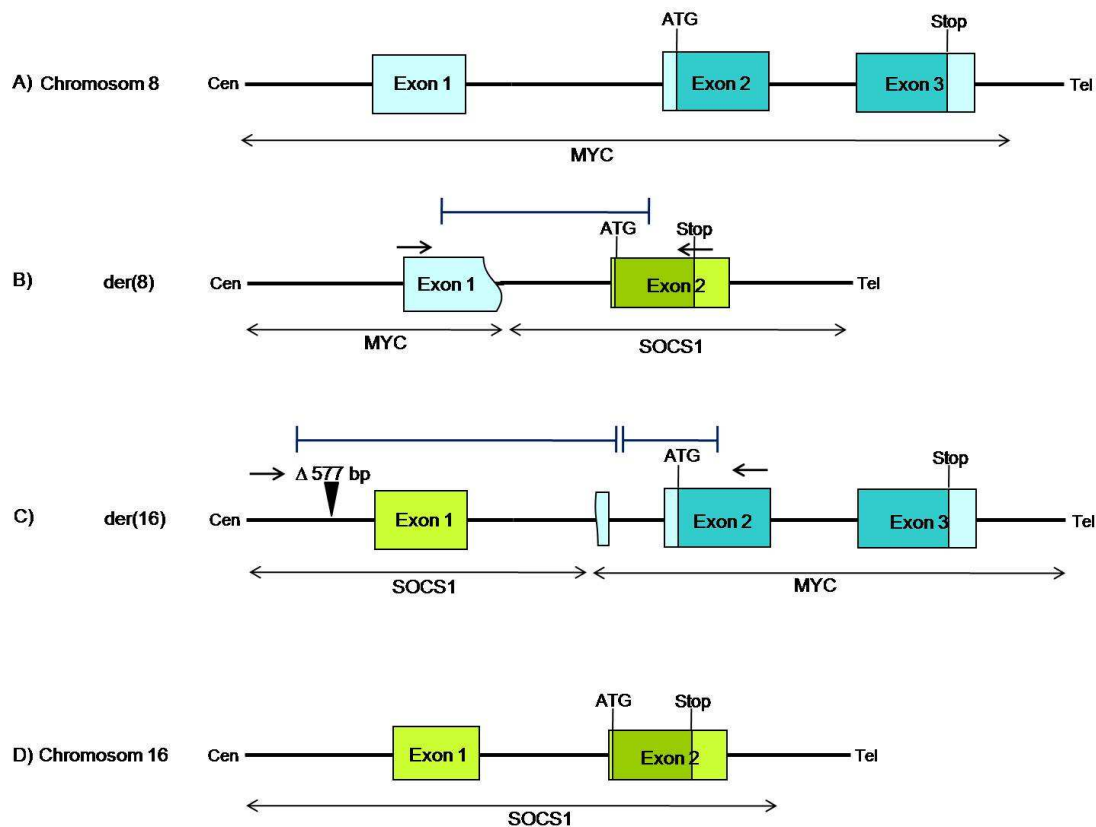


Abbildung 9: Schematische Darstellung der MYC/SOCS1-Translokation im B-NHL-Fall 4 (MPI-248). A) Schematische Darstellung der Keimbahnkonfiguration von MYC auf Chromosom 8. Das Gen besteht aus drei Exons, wobei der kodierende Bereich sich auf Exon 2 und 3 beschränkt. B) Schematische Darstellung des derivativen Chromosom 8: Der Bruchpunkt der Translokation befindet sich in Exon 1 des MYC-Gens (Position 128748745 bp vom p-Terminus von Chromosom 8) und verbindet einen Teil des Introns 1 von SOCS1 (Position 11349767 bp vom p-Terminus von Chromosom 16) mit Exon 1 des MYC-Gens. Die kodierende Sequenz des SOCS1-Gens bleibt dabei erhalten. C) Schematische Darstellung des derivativen Chromosom 16: Durch die Translokation wurde das Intron 1 von SOCS1 (Position 11349776 bp vom p-Terminus von Chromosom 16) mit dem MYC-Locus (Position 128748805 bp vom p-Terminus von Chromosom 8) verknüpft. Im 5'-Bereich 52 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des SOCS1 Gen wurde eine 577 bp große Deletion identifiziert. D) Schematische Darstellung der Keimbahnkonfiguration von SOCS1 auf Chromosom 16. Das Gen besteht aus zwei Exons, wobei die kodierende Region nur Exon 2 umfasst. Die Pfeile zeigen die Bindungsorte der Primer für die LD-PCR an. Die Linien geben die sequenzierten Bereiche an. Sequenzpositionen wurden in der humanen Referenz-Sequenz GRCh37/hg19 angegeben.

Die Translokation in Fall 4 betrifft das SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*) – Gen. Der Bruchpunkt liegt in Exon 1 des MYC-Gens und im Intron 1 des SOCS1-Gens. Durch die Translokation kommt es zum Austausch der jeweiligen kodierenden Exons mit dem regulatorischen Bereich des anderen Gens (Abbildung 9). Ob es dadurch zu einer deregulierten Expression eines oder beider Gene kommt, konnte soweit nicht geklärt werden.

Die Expressionsdaten einer anderen Studie, die 220 B-NHL-Fälle aus dem MMML-Verbund umfasst (Hummel et al., 2006), zeigte in Fall 4 (MPI-248) keine von den anderen untersuchten Fällen abweichende Expression von SOCS1 und MYC. In

der 5'-regulatorischen Region von SOCS1 konnte eine 577 bp große Deletion amplifiziert werden.

SOCS1 inhibiert die Interferon (IFN)-Signalgebung durch die Interaktion mit den IFN- α -Rezeptor 1- und IFN- γ -Rezeptor -Untereinheiten und unterdrückt so die Interferon-Aktivierung der STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Qing et al., 2005; Fenner et al., 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass SOCS1 in der Lage ist eine Reihe weiterer Signalwege zu unterdrücken. So unterstützt SOCS1 die Degradierung von p65, einer wichtigen Komponente des NF- κ B-Signalweges (Ryo et al., 2003) und die Degradierung von ASK1, einer Kinase oberhalb des JNK und p38 Signalweges (He et al., 2006b). Inaktivierende SOCS1 Mutationen und Deletionen wurden in einigen Fällen des Diffus-großzelligen B-Zell Lymphoms, dem Follikulärem Lymphom, dem primär mediastinalem B-Zell Lymphom und dem Hodgkin Lymphom gefunden (Melzner et al., 2005; Mestre et al., 2005; Melzner et al., 2006; Weniger et al., 2006; Mottok et al., 2007; Mottok et al., 2009). SOCS1 ist ein wichtiger Inhibitor verschiedener Signalwege und besitzt eine Aufgabe als Tumorsuppressor. Die Translokation ist also die interessante Kombination eines Proto-Onkogens (MYC) mit einem Tumorsuppressor (SOCS1).

Tabelle 3: Zusammenfassung der Nicht-Ig/MYC-LDI-PCR.

Fall (MPI-Nummer)	Molekulare Diagnose	<i>Upstream</i> -MYC-LDI-PCR	<i>Downstream</i> -MYC-LDI-PCR
1 (028)	mBL	-	-
2 (031)	nicht-mBL	-	-
3 (121)	intermediär	-	-
4 (248)	intermediär	t(8;16)(q24;p13)	-
5 (266)	intermediär	-	-
6 (271)	mBL	-	-
7 (291)	nicht-mBL	-	-
8 (356)	intermediär	-	-
9 (407)	intermediär	-	-
10 (414)	nicht-mBL	-	-
11 (423)	intermediär	-	-
12 (507)	nicht-mBL	-	-
13 (560)	nicht-mBL	-	-

-: Keine Translokation amplifiziert. mBL: molekulares Burkitt-Lymphom; nicht-mBL: Nicht-molekulares Burkitt-Lymphom; intermediär: Lymphom intermediär zwischen Burkitt-Lymphom und diffus großzelligem Lymphom. Alle 13 B-NHL-Fälle wurden mit der *Upstream* und *Downstream*-MYC-LDI-PCR analysiert. In Fall 4 (MPI-Nummer 248) wurde mit der *Upstream*-MYC-LDI-PCR eine MYC-Translokation zu Chromosom 16 identifiziert (t(8;16)(q24;p13)).

3.4 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner der Immunglobulin-Schwerketten (IgH) Region in B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen (B-NHL)

Die Bruchpunkte der chromosomalen Translokationen in den Ig-Loci sind die Folge der molekularen Prozesse in B-Zellen, die mit DNA-Strangbrüchen assoziiert sind und damit ein Risiko für Translokationsereignisse darstellen. So finden sich Bruchpunkte an J_H- oder D_HJ_H-Gensegmenten und zeigen zusätzliche, nicht keimbahnkodierte "N"-Nukleotide, was auf die Entstehung der Translokation während einer V(D)J-Rekombination hinweist, die mit Doppelstrangbrüchen assoziiert ist (Willis und Dyer, 2000; Küppers und Dalla-Favera, 2001). Außerdem sind einige Bruchpunkte in mutierten V-Genen vorzufinden, was auf eine Entstehung während der somatischen Hypermutation hindeutet, bei der ebenfalls DNA-Doppelstrangbrüche entstehen (Goossens et al., 1998). Viele Bruchpunkte finden sich auch in den Switch-Regionen der konstanten Gene des Immunglobulin-Schwerketten (IgH) -Locus, da es dort infolge der Klassenwechselrekombination zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommt.

Im Zuge des Verbundes „Molekulare Mechanismen maligner Lymphome“ (MMML) wurde eine große Fallzahl von über 900 aggressiven B-NHL mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) auf IgH Translokationen untersucht. Ziel war es, Translokationen des IgH-Locus mit unbekanntem Partner zu identifizieren. Unter diesen Fällen, die im Rahmen des MMML-Verbundes untersucht wurden, fanden sich mehr als 70 Fälle mit Hinweisen auf Ig-Locus-assoziierte Bruchpunkte, bei denen die Beteiligung typischer Partner-Onkogene, wie MYC, CCND1, BCL2, BCL6 oder MALT1, ausgeschlossen wurden.

28 dieser Fälle wurden mit Hilfe der vier verschiedenen IgH-LDI-PCR-Ansätze, S μ -, S γ -, S α - und JH-LDI-PCR, untersucht (Tabelle 4). Die JH- und die S μ -LDI-PCR wurden von im Rahmen der Diplomarbeit von R. Schmitz etabliert, während die S γ - und die S α -LDI-PCR in dieser Arbeit etabliert wurden. Ziel war es, eventuelle neue Onkogene zu identifizieren und zu charakterisieren.

Tabelle 4: Zusammenfassung der analysierten B-NHL-Fälle.

Fall (MPI- Nummer)	Molekulare Diagnose	Klassenwechsel	Amplifizierte mit Chromosom :	Translokation
1 (009)	DLBCL ABC			
2 (031)	DLBCL ABC			
3 (059)	DLBCL GCB	Switch μ/γ		
4 (063)	DLBCL Typ III	Switch μ/α	3q27	
5 (064)	DLBCL GCB			
6 (065)	DLBCL GCB	Switch μ/γ		
7 (078)	DLBCL GCB			
8 (093)	DLBCL GCB			
9 (106)	DLBCL ABC		14q24	
10 (108)	DLBCL ABC	Switch μ/α ; Switch μ/γ	7q31	
11 (130)	DLBCL ABC			
12 (131)	DLBCL ABC	Switch μ/α ; Switch μ/γ		
13 (136)	DLBCL GCB	Switch μ/γ		
14 (142)	DLBCL GCB	Switch μ/γ		
15 (145)	DLBCL Typ III	Switch μ/α ; Switch μ/γ		
16 (155)	DLBCL Typ III	Switch μ/γ		
17 (164)	DLBCL ABC	Switch μ/γ	1p13	
18 (169)	DLBCL Typ III			
19 (186)	DLBCL Typ III	Switch μ/γ	19p13	
20 (233)	DLBCL GCB		6p25	
21 (239)	DLBCL ABC			
22 (273)	DLBCL Typ III			
23 (339)	DLBCL GCB		3q27	
24 (346)	DLBCL ABC			
25 (374)	DLBCL ABC			
26 (382)	DLBCL GCB			
27 (450)	DLBCL GCB			
28 (592)	DLBCL GCB			

28 B-NHL-Fälle wurden mit allen vier LDI-PCR-Ansätzen auf Translokationen untersucht. DLBCL: Diffus großzelliges-B-Zell-Lymphom. ABC: Aktivierter B-Zell-Typ. GCB: Keimzentrums-B-Zell-Typ. Typ III: Typ III-Gruppe. Aufgrund eines Klassenwechsels kann es in der Keimbahnsequenz zum Auftreten einer neuen Restriktionserkennungsstelle kommen, dadurch ist die Amplifikation eines Klassenwechsels in den Switch-LDI-PCR-Ansätzen möglich. Dies wird als weitere positive Kontrolle für die Funktionalität der LDI-PCR bewertet. Die Klassenwechsel wurden mit den jeweiligen Switch-LDI-PCRs, also α oder γ -LDI-PCR, und dem Switch μ -LDI-PCR-Ansatz detektiert. Das Auftreten eines Switch μ/α - und gleichzeitig eines Switch μ/γ -Klassenwechsels erklärt sich eventuell durch das Auftreten von zwei verschiedenen Klassenwechseln auf beiden Allelen, es könnte aber auch ein Intratumorklon-Klassenwechsel vorliegen oder er erklärt sich dadurch, dass der Tumorzellanteil der B-NHL-Fälle zwar bei mehr als 70% liegt, aber die Amplifikation von Nicht-Tumorzellen vereinzelt trotzdem möglich ist. Bei der Analyse der Fälle wurden insgesamt sieben Translokationen amplifiziert.

Von den 28 analysierten B-NHLs konnte in sieben Fällen eine Translokation amplifiziert werden. In Tabelle 5 wurden die einzelnen Translokationen kurz zusammengefasst und im weiteren Verlauf genauer beschrieben.

Tabelle 5: Zusammenfassung der amplifizierten Translokationen.

Fall (MPI-Nummer)	Molekulare Diagnose	Transloziertes Chromosom	Annotiertes Gen an der Bruchpunktstelle
4 (063)	DLBCL Typ III	3q27	BCL6
9 (106)	DLBCL ABC	14q24	BRF1
10 (108)	DLBCL ABC	7q31	IMMP2L
17 (164)	DLBCL ABC	1p13	BCAS2
19 (186)	DLBCL TYP III	19p13	PVRL2
20 (233)	DLBCL GCB	6p25	EXOC2
23 (339)	DLBCL GCB	3q27	Kein annotiertes Gen direkt an der Bruchpunktstelle

DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom. ABC: Aktivierter B-Zell-Typ. GCB: Keimzentrums-B-Zell-Typ. Typ III: Typ III-Gruppe. In sieben der 28 analysierten Fälle wurde eine Translokation amplifiziert.

Von den sieben Translokationen werden drei (Fall 4, 9 und 23, Tabelle 5) in dieser Arbeit nur kurz angerissen, da es sich bei ihnen schon um bereits bekannte und beschriebene Ereignisse handelt. Die weiteren Fälle werden im Folgenden genauer charakterisiert.

3.4.1 Translokationen t(3;14)(q27;q31) in Fall 4 (MPI-Nummer 63) und Fall 23 (MPI-Nummer 339) betreffen Chromosom 3q27

Beide Translokationen betreffen Chromosom 3q27. In Fall 4 verbindet die Translokation den Switch μ -Locus mit dem BCL6-Gen, einem bekannten und oft vorkommenden Translokationspartner in DLBCL (Lo Coco et al., 1994). Der Bruchpunkt dieser Translokation befindet sich in der 5'-Region des ersten Introns von BCL6 (Position 1523 in der Referenzsequenz NG_007149) und damit im Bereich der Hauptbruchpunktregion (MBR) dieses Gens (Akasaka et al., 2000). Die Translokation stellt eine klassische Promotor-Substitution dar, indem die Ig-Enhancer Kontrolle über die kodierenden Exons von BCL6 übernehmen.

In Fall 23 liegt die Bruchstelle in Position 187661096 bp vom p-Terminus von Chromosom 3. Das erste und einzige annotierte Gen in dieser Region ist BCL 6 und befindet sich circa 200 kb stromabwärts des Bruchpunktes. Butler et al. beschrieben eine alternative Bruchpunktregion etwa 245 - 285 kb stromaufwärts von Exon 1 des BCL6-Gens, die in mehreren Lymphomen mit 3q27 Translokation identifiziert wurde, bei der die MBR nicht betroffen war (Butler et al., 2002). Die Translokation in Fall 23

betrifft also vermutlich ebenfalls das BCL6-Gen. Die Translokation in Fall 4 wurde in der FISH-Analyse des MMML-Verbundes übersehen, aber das die Translokation in Fall 23 das BCL6-Gen betreffen könnte, konnte in der FISH-Analyse aufgrund der großen Distanz wahrscheinlich nicht erkannt werden.

3.4.2 Deletion in Chromosom 14q21 – 14q32 in Fall 9 (MPI-Nummer 106)

In Fall 9 zeigte sich, dass hier keine Translokation im eigentlichen Sinne vorlag, sondern es sich um eine größere interstitielle Deletion in Chromosom 14 handelt. Die Deletion erstreckt sich von Chromosom 14q24.1 bis 14q32.33 und verknüpft damit den Switch μ -Locus mit Exon 2 des BRF1-Gens. Diese Art der interstitiellen Deletion, in der der IgH-Locus involviert ist, wurde von Pospisilova et al. bereits beschrieben (Pospisilova et al., 2007). Welche Auswirkung diese Deletion auf die Pathogenese der B-NHL-Lymphome hat, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

3.4.3 Translokation t(7;14)(q31;q32) in Fall 10 (MPI-Nummer 108)

Die Translokation in Fall 10 wurde mit der Switch μ -LDI-PCR amplifiziert und betrifft Chromosom 7q31.3. Dadurch wird der Switch μ -Locus mit dem Intron 3 des IMMP2L (*Inner Mitochondrial Membrane Peptidase Subunit 2 Like*) -Gens verbunden (Abbildung 10).

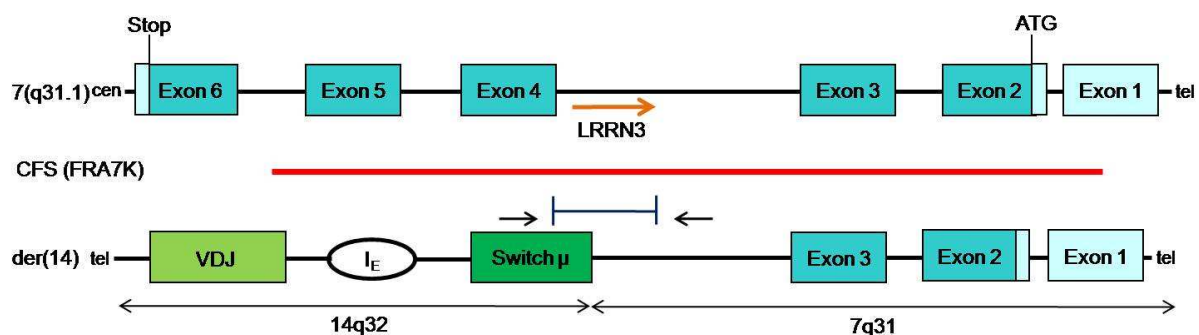


Abbildung 10: Schematische Darstellung der IgH/IMMP2L Translokation in Fall 10. In der oberen Hälfte der Abbildung befindet sich die schematische Darstellung des IMMP2L-Gens auf Chromosom 7q31.1. Innerhalb des 425 kb großen Intron 3 von IMMP2L befindet sich der Lokalisationsort von LRRN3, der orangefarbene Pfeil gibt die ungefähre Position und Transkriptionsrichtung von LRRN3 an. Der Bruchpunkt der Translokation befindet sich ca. 66 kb stromabwärts von LRRN3. Der Genort von IMMP2L umfasst weiterhin die *Common Fragile Site* (CFS) FRA7K, angezeigt durch die rote Linie. In der unteren Hälfte der Abbildung wurde die Translokation schematisch dargestellt. Der Bruchpunkt befindet sich in Position 110831970 bp vom p-Terminus von Chromosom 7 und 106324205 bp vom p-Terminus von Chromosom 14 (GRCh37/hg19). Das Produkt der Translokation ist einerseits ein *Head-to-Head*-Konstrukt mit gegenläufigen Transkriptionsrichtungen von IgH-Locus und IMMP2L-Gen und sie scheint ein Telomer-Telomer-Produkt zu sein. Die schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsorte der

Primer für die LD-PCR an. Die blaue Linie gibt den sequenzierten Bereich an. tel: Telomer. cen: Centromer. I_E: Intron Enhancer.

Die Translokation wurde durch eine direkte, bruchpunktüberspannende Langstrecken-(LD)-PCR bestätigt. Der Versuch, den reziproken Part dieser Translokation mit Hilfe von 5'-RACE und LD-PCR mit verschiedenen Primerkombinationen zu klonieren war nicht erfolgreich.

Das ca. 425 kb große Intron 3 von IMMP2L umfasst zusätzlich den Genort von LRRN3 (*Leucine Rich Repeat Neuronal 3*) (Abbildung 10). Der Bruchpunkt der Translokation liegt 66460 bp stromabwärts des letzten kodierenden Exons von LRRN3, damit ist das Gen nicht Teil der hier amplifizierten Translokation. Weiterhin befindet sich innerhalb der Region des 899 kb großen IMMP2L-Gens die 450 kb große *Common Fragile Site* (CFS) FRA7K. Diese CFS sind chromosomale Regionen, in denen es verstärkt zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommen kann (Arlt et al., 2006). Einige CFS, wie z. B. FRA3B und FRA16D sind zusammen mit Tumorsuppressoren lokalisiert (Arlt et al., 2006).

Das IMMP2L-Gen selbst setzt sich aus sechs Exons zusammen und kodiert ein 1522 bp langes Transkript, dessen offenes Leseraster in Exon 2 beginnt und in Exon 6 endet. Das daraus resultierende Produkt umfasst 175 Aminosäuren.

Das Gen ist das humane Homolog zu dem Hefe *Inner Mitochondrial Membrane Peptidase Subunit 2* und ist verantwortlich für die Reifung von mitochondrialen Proteinen des Zwischenmembranraums.

Durch die Translokation werden das IMMP2L-Gen und der IgH-Locus in einer *Head-to-Head*-Konformation zusammengebracht, dies bedeutet, dass die jeweiligen Transkriptionsrichtungen gegenläufig sind und die Entstehung eines Fusionsproduktes unwahrscheinlich ist. Außerdem zerstört die Translokation die kodierende Sequenz des IMMP2L-Gens.

Auffallend an der Translokation ist, dass die Richtung der analysierten Sequenzen die Schlussfolgerung zuließ, dass es sich hierbei um eine Telomer-Telomer-Verbindung handelt (Abbildung 10). Diese Verbindungen gehen aber normalerweise schnell im Verlauf der Zellteilungen verloren. Bislang wurde nur ein 3465 bp großer Bereich des Intron 3 sequenziert, deshalb können keine Angaben über den weiteren Verlauf der Sequenz gemacht werden. Es ist also nicht geklärt, ob z. B. Inversionen innerhalb des Chromosom 7 vorliegen, die fälschlicherweise ein Telomer-Telomer-Produkt vorspiegeln. Auch die SNP-Chip-Daten und FISH-

Analysen dieses Falles von Kooperationspartnern innerhalb des MMML-Verbunds sprechen dafür, dass die Konfiguration dieser Translokation nicht eindeutig ist.

Die Sonden der FISH-Analyse binden im Centromer- und im Telomer-Bereich des IMMP2L-Gens und zeigen ein intaktes Allel von Chromosom 7 und einen unbalanzierten Verlust des anderen Allels im telomeren Bereich von Chromosom 7. Dieser Befund stimmt mit den SNP-Chip Daten dieses Falles überein. Auch hier wurden ein intaktes Allel und eine Deletion des anderen Allels im distalen Bereich ab dem IMMP2L-Gen identifiziert. Die Daten der FISH- und SNP-Chip-Analysen sprechen also eher dafür, dass der Sequenzbereich von Chromosom 7, der anhand des LDI-PCR-Befundes an den Switch μ -Locus transloziert ist, eigentlich deletiert wurde. Dies deutet stark darauf hin, dass es zu einer Konfigurationsänderung z. B. durch eine Inversion innerhalb von Chromosom 7 gekommen ist.

Durch das Vorhandensein einer CFS in der IMMP2L-Region und der Zerstörung der kodierenden Region durch die Translokation, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei eventuell um einen neuen Tumorsuppressor anstatt eines neuen Onkogens handeln könnte. Deshalb wurde durch eine Mutationsanalyse des anderen Allels von IMMP2L überprüft, ob das verbliebene Allel inaktivierende Mutationen aufweist. Alle fünf kodierenden Exons (Exon 2- 6) wurden amplifiziert und sequenziert, aber es konnten keine Mutationen oder Deletionen festgestellt werden.

Da IgH-Locus assoziierte Translokationen aber eher zur deregulierten Expression eines betroffenen Gens führen, teilweise auch von Genen, die mehrere Kilobasen von der eigentlichen Bruchstelle entfernt liegen, wurden die Genexpressionsdaten von Fall 10 überprüft. Die Daten stammen aus einer früheren Studie des MMML-Verbundes (Hummel et al., 2006). Leider gibt es keine Probe für das IMMP2L-Gen auf dem Genchip U133A, so dass keine Aussage über eine deregulierte Expression gemacht werden kann. Die in einem Umkreis von 2 MB um das IMMP2L-Gen annotierten Gene wurden ebenfalls überprüft (Tabelle 6), zeigten aber keinen Unterschied in ihrer Genexpression im Vergleich zu 10 anderen DLBCL, die diese Translokation nicht aufwiesen.

Tabelle 6: Lokalisation der annotierten Gene im Bereich um den IMMP2L-Locus und Genexpressionsvergleich mit anderen DLBCLs.

Gen	Lokalisation auf Chromosom 7 (bp vom p-Terminus [GRCh37/hg19])	Genchip-Wert für Fall 10 mit Translokation im Vergleich zu mittlerem Genchipwert (plus Varianz) der 10 Vergleichsfälle
IMMP2L	110303110 - 111202347	k. A.
LRRN3	110731063 - 110765510	-
DOCK4	111366165 - 111846466	-
IRFD1	112063024 - 112121072	-
C7orf66	108524033 - 108524644	-
THAP5	108194988 - 108210194	-
NRCAM	107788083 - 108097161	-

Die Tabelle gibt die Position von IMMP2L und der Gene auf Chromosom 7 an, die in einem Bereich von ungefähr 2 Mb um den Lokalisationsort von IMMP2L annotiert sind, da es ist bekannt ist, dass die regulatorischen Einheiten des IgH-Locus auch noch auf die Aktivität von Genen einwirken können, die mehrere kb vom Translokationsbruchpunkt entfernt liegen. k. A.: Keine Angabe über die Expression, da eine entsprechende Probe auf dem verwendeten Genchip U133A fehlt. -: Kein Unterschied in der Expression dieses Gens im Vergleich zu 10 anderen DLBCLs ohne die Translokation.

3.4.4 Translokation t(1;14)(p13;q32) im Fall 17 (MPI-Nummer 164)

Die Translokation in Fall 17 wurde mit Hilfe der Switch γ -LDI-PCR amplifiziert. Durch die Translokation wird der Switch γ -Bereich mit Intron 4 des BCAS2 (*Breast Carcinoma Amplified Sequence 2*)-Gens verbunden. Die Translokation wurde durch eine direkte, bruchpunktüberspannende PCR bestätigt. Der reziproke Bruchpunkt konnte durch eine LD-PCR amplifiziert werden (Abbildung 11).

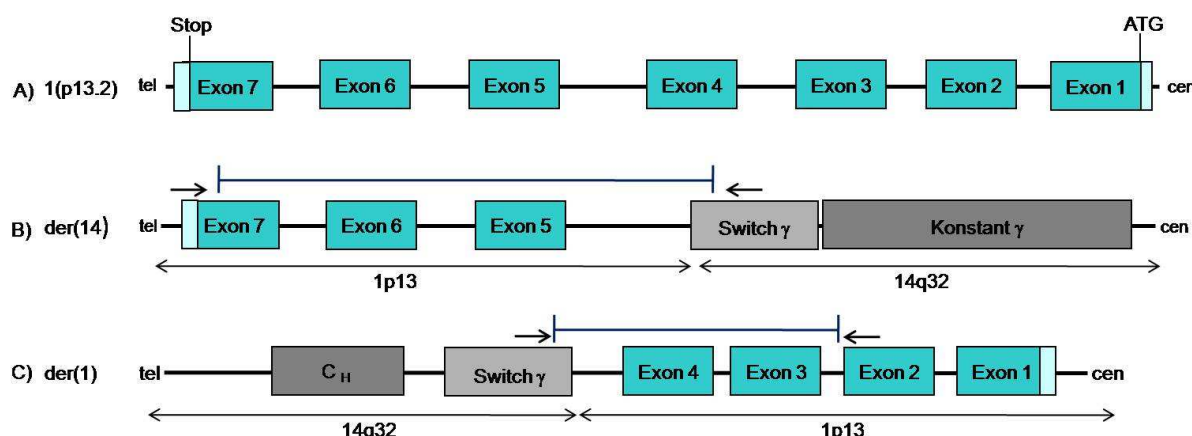


Abbildung 11: Schematische Darstellung der IgH/BCAS2 Translokation in Fall 17. A) Schematische Darstellung der Keimbahnkonfiguration des BCAS2-Gens auf Chromosom 1. Eingezeichnet sind die sieben Exons, die kodierende Region beginnt in Exon 1 und endet in Exon 7. B) Darstellung des derivativen Chromosom 14. Die Translokation verbindet die Switch γ -Region (Position 106112628 bp vom p-Terminus von Chromosom 14) mit Intron 4 des BCAS2-Gens (Position 115116231 bp vom p-Terminus von Chromosom 1). C) Darstellung des reziproken Bruchpunktes auf dem derivativen Chromosom 1. Die Position des Bruches im Intron 4 von Chromosom 1 liegt bei

115116329 bp vom p-Terminus und die Position in der Switch γ -Region von Chromosom 14 bei 106112628 bp vom p-Terminus. Das Ergebnis der Translokation ist ein *Head-to-Head*-Konstrukt mit gegenläufigen Transkriptionsrichtungen des IgH-Locus und BCAS2. Die schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsorte der Primer für die LD-PCR an. Die blaue Linie gibt die sequenzierten Bereiche an. tel: Telomer. cen: Centromer. Sequenzpositionen wurden in der humanen Referenz-Sequenz GRCh37/hg19 angegeben.

Das von der Translokation betroffene BCAS2-Gen umfasst sieben Exons. Die kodierende Region beginnt in Exon 1 und endet in Exon 7. Das Transkriptionsprodukt ist 1320 bp lang und kodiert für ein Protein aus 225 Aminosäuren. Das BCAS2-Gen ist ein transkriptioneller Koaktivator des Estrogenrezeptors.

Durch die Translokation entsteht ein *Head-to-Head*-Konstrukt, in dem die jeweiligen Transkriptionsrichtungen der beiden betroffenen Gene gegenläufig sind. Ein Fusionsprodukt ist also nicht möglich. Vielmehr zerstört die Translokation die kodierende Sequenz von BCAS2.

Die FISH-Analysen der Kooperationspartner innerhalb des MMML-Verbundes bestätigten die Translokation in diesem Fall (36 von 50 Zellen zeigten die 1p13 – 14q32 Fusion), aber weitere Fälle mit dieser Translokation wurden mit den entsprechenden FISH-Sonden nicht gefunden.

Weiterhin wurde die Expression von BCAS2 und umliegender annotierter Gene in einem Bereich von ungefähr 1 MB um das BCAS2-Gen herum in Fall 17 überprüft (Tabelle 7) und mit den Expressionsdaten aus 10 weiteren DLBCL-Fällen verglichen, die diese Translokation nicht besitzen. Die Genexpressionen in Fall 17 zeigten in keinem der Gene einen Unterschied zu den 10 anderen DLBCL-Fällen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Lokalisation der annotierten Gene im Bereich um den BCAS2-Locus und Genexpressionsvergleich mit anderen DLBCLs.

Gen	Lokalisation auf Chromosom 1 (bp vom p-Terminus [GRCh37/hg19])	Genchip-Wert für Fall 17 mit Translokation im Vergleich zu mittlerem Genchipwert (plus Varianz) der 10 Vergleichsfälle
BCAS2	115110178 - 115124265	-
DENMD2C	115127196 – 115212732	k. A.
TRIMM33	114945401 – 115053781	k. A.
NRAS	115247079 – 115252391	-
AMPD1	115215722 – 115238176	-
CSDE1	115259538 – 115292828	-
SIKE	115312107 – 115323308	-
SYCP1	115397455 – 115537988	-
SYT6	114631915 – 114641887	k. A.
HIPK1	114471996 – 114514693	-
TSHB	115572415 – 115576941	-
TSPAN2	115590635 – 115632121	-
NGF	115828537 – 115880857	-
BCL2L15	114419437 – 114430169	k. A.
AP4B1	114437677 – 114447741	k. A.
DCLRE13	114447915 – 114456707	k. A.
OLFML3	114522030 – 114524875	-
VANGL1	116184574 – 116240845	-
PTPN22	114356434 – 114414375	-
RSBN1	114304455 – 114355070	-
MAGI3	113933475 – 114228535	k. A.

Die Tabelle gibt die Position von BCAS2 und der Gene auf Chromosom 1 an, die in einem Bereich von ungefähr 1 Mb um den Lokalisationsort von BCAS2 annotiert sind. k. A.: Keine Angabe über die Expression, da eine entsprechende Probe auf dem verwendeten Genchip U133A fehlt. -: Kein Unterschied in der Expression dieses Gens im Vergleich zu 10 anderen DLBCLs ohne die Translokation.

3.4.5 Translokation t(14;19)(q32;q13) in Fall 19 (MPI-Nummer 186)

Die Translokation in Fall 19 wurde mit der Switch μ -LDI-PCR amplifiziert. Die Translokation verbindet die Switch μ -Region mit den ersten 66 Basenpaaren der 5'-untranslatierten Region (GenBank/EMBL/DDBJ Eintragsnummer NC_000019.9) des PVRL2 (*Poliovirus Receptor-Like 2*)-Gen (Abbildung 12). Die Bestätigung der Translokation erfolgte über eine direkte, bruchpunktüberspannende LD-PCR. Die Amplifizierung des reziproken Bruchpunktes wurde mit Hilfe der LD-PCR mit verschiedenen Primerkombinationen versucht, war aber nicht erfolgreich.

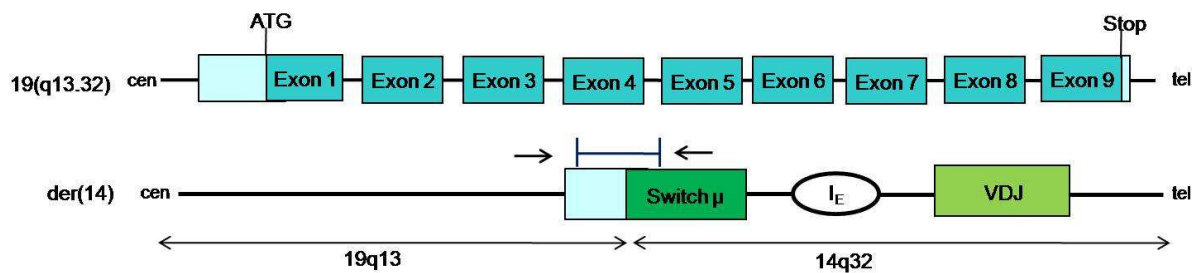


Abbildung 12: Schematische Darstellung der IgH/PVRL2-Translokation in Fall 19. In der oberen Abbildung ist die schematische Darstellung der Keimbahnkonfiguration des PVRL2-Gen abgebildet. Das PVRL2-Gen besteht aus neun Exons, die kodierende Sequenz beginnt in Exon 1 und endet in Exon 9. In der unteren Hälfte der Abbildung wurde das derivative Chromosom 14 dargestellt. Die Translokation verbindet die Switch μ -Region in Position 106326283 bp vom p-Terminus von Chromosom 14 mit den ersten 66 bp der 5'-untranslatierten Region des PVRL2-Gens in Position 45349458 bp vom p-Terminus von Chromosom 19 (GRCh37/hg19). Die hier dargestellte Translokation ergibt ein *Head-to-Head*-Konstrukt mit gegenläufigen Transkriptionsrichtungen der beteiligten Gene. Die kodierende Region des PVRL2-Gens wurde aber nicht zerstört, sondern befindet sich möglicherweise auf dem noch unbekannten reziproken Part der Translokation. Die schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsorte der Primer für die LD-PCR an. Die blaue Linie gibt den sequenzierten Bereich an. tel: Telomer. cen: Centromer. I_E: Intron Enhancer.

Das Gen PVRL2 umfasst 9 Exons, die ein 43093 bp langes Transkript kodieren. Das offene Leseraster, beginnend in Exon 1 kodiert für 538 Aminosäuren. Das resultierende Protein ist Bestandteil der Plasmamembran und dort eine der Komponenten in der Adhärenz-Verbindung zwischen den Zellen. Außerdem dient es bestimmten Stämmen des Herpesvirus als Eintrittsstelle in die Zellen (Warner et al., 1998).

Die FISH-Analysen der Kooperationspartner aus dem MMML-Verbund konnten zwar die Fusion des IgH-Locus mit Chromosom 19 in Fall 19 bestätigen (die Fusion wurde in über 90% der Zellen gefunden), fanden in 26 untersuchten Fällen aber keinen weiteren Fall mit dieser Translokation.

Durch die Translokation wurde die kodierende Region des PVRL2-Gens nicht zerstört, allerdings ist sie kein Bestandteil der hier amplifizierten Translokation. Ob die kodierende Sequenz des PVRL2 Teil des reziproken Bruchpunktes ist, muss noch gezeigt werden.

Eine 5'RACE mit sequenzspezifischen PVRL2 Primer der mRNA aus Fall 19 war leider nicht erfolgreich und konnte somit nicht zur Klärung beitragen. Allerdings zeigen die Genexpressionsdaten des PVRL2-Gens in diesem Fall, dass das Gen dreimal höher exprimiert ist, als in 15 anderen DLBCL-Fällen, die mit diesem Fall verglichen wurden und die Translokation nicht aufwiesen (Abbildung 13)

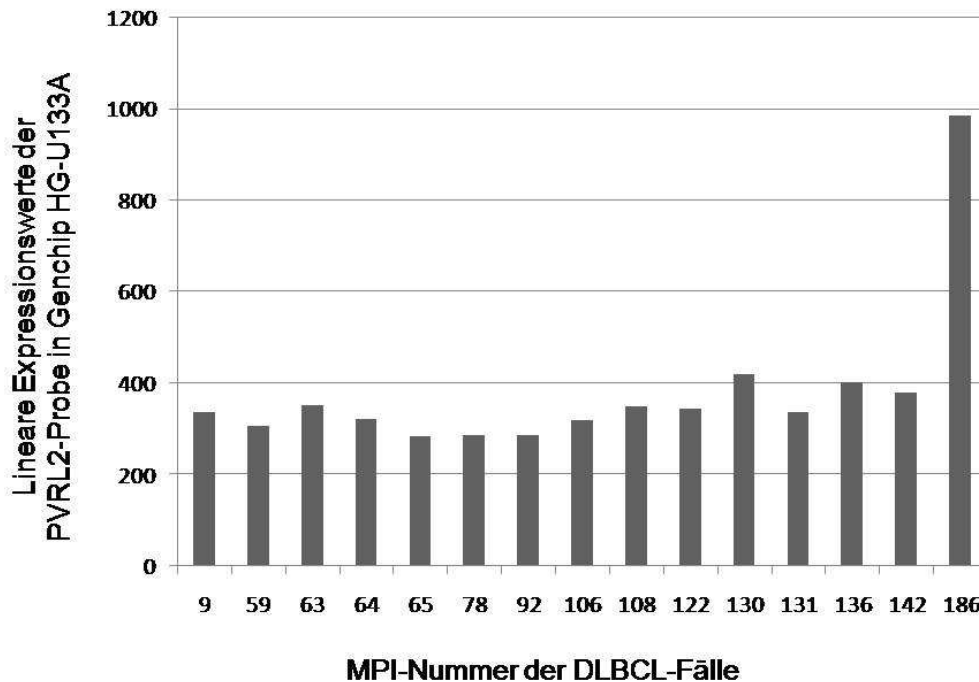


Abbildung 13: Säulendiagramm der Genexpression des PVRL2-Gens im Vergleich mit 15 anderen DLBCL-Fällen. Aufgetragen ist hier die lineare Expression des PVRL2-Gens in Fall 19 (MPI-Nummer 186) und 15 weiterer DLBCL-Fälle, die keine t(14;19) Translokation aufwiesen. Die Daten stammen aus einer früheren MMML-Verbund-Studie (Hummel et al., 2006). Als Genchip wurde HG-U133A eingesetzt. Für PVRL2 gibt es nur eine Probe auf diesem Genchip. Ab einem Wert von 100 und höher gelten die Gene als exprimiert. In Fall 19 (MPI 186) konnte eine höhere Expression des PVRL2-Gens als in den anderen DLBCL-Fällen beobachtet werden.

Weiterhin wurden auch die Expressionen anderer Gene überprüft, die in einer Region ca. 1 Mb um das PVRL2-Gen herum annotiert sind, es wurden aber auch hier keine Veränderung in den Expressionsdaten im Vergleich mit 10 anderen Fällen ohne diese Translokation festgestellt. (Tabelle 8).

Tabelle 8: Lokalisation der annotierten Gene im Bereich um den PVRL2-Locus und Genexpressionsvergleich mit anderen DLBCLs.

Gen	Lokalisation auf Chromosom 19 (bp vom p-Terminus [GRCh37/hg19])	Genchip-Wert für Fall 19 mit Translokation im Vergleich zu mittlerem Genchipwert (plus Varianz) der 10 Vergleichsfälle
TOMM40	45394477 – 45406935	-
BCAM	45312338 – 45323610	-
APOE	45409039 – 45412649	-
APOC1	45417921 – 45422606	-
CBLC	45281126 – 45303902	-
APOC4	45445495 – 45448751	-
APOC2	45449243 – 45452817	-
BCL3	45251978 – 45263300	-
RELB	45504712 – 45541452	-
CECAM19	45174724 – 45187625	k. A.
SFRS16	45542298 – 45574213	-
PVR	45147098 – 45162361	-
GEMIN7	45582518 – 45594782	-
NKPD1	45653009 – 45663408	k. A.
BLOC1S3	45682003 – 45685057	k. A.
EXOC3L2	45715879 - 45737469	k. A.
CECAM20	45010211 – 45033548	k. A.
ZNF229	44930426 – 44952665	k. A.
CKM	45809672 – 45826233	-
ZNF285	44889809 – 44905777	k. A.
ZFP112	44830707 - 44860856	-
CEBPA	33790936 – 33793320	-
CEBPG	33864609 – 33873592	-
SPIB	50922195 - 50934305	-

Die Tabelle gibt die Position von PVRL2 und der Gene auf Chromosom 19 an, die in einem Bereich von ungefähr 1 Mb um den Lokalisationsort von PVRL2 annotiert sind. Weiterhin wurden auch die Gene CEBPA, CEBPG und SPIB aufgenommen, obwohl sie weiter entfernt liegen, da sie in früheren Studien als IgH-Translokationspartner identifiziert wurden (Robinson et al., 2004; Chapiro et al., 2006; Akasaka et al., 2007; Lenz et al., 2007). k. A.: Keine Angabe über die Expression, da eine entsprechende Probe auf dem verwendeten Genchip U133A fehlt. -: Kein Unterschied in der Expression dieses Gens im Vergleich zu 10 anderen DLBCLs ohne die Translokation.

3.4.6 Translokation t(6;14)(p25;q32) in Fall 20 (MPI-Nummer 233)

Fall 20 ist interessanterweise einer der selteneren kindlichen non-mBL-Fälle. Die Translokation wurde mit der Switch μ -LDI-PCR amplifiziert und verknüpft den Switch μ -Locus mit dem EXOC2 (*Exocyst Complex Component 2*) –Gen (Abbildung 14). Die Translokation wurde mit Hilfe einer direkten, bruchpunktüberspannenden LD-PCR bestätigt.

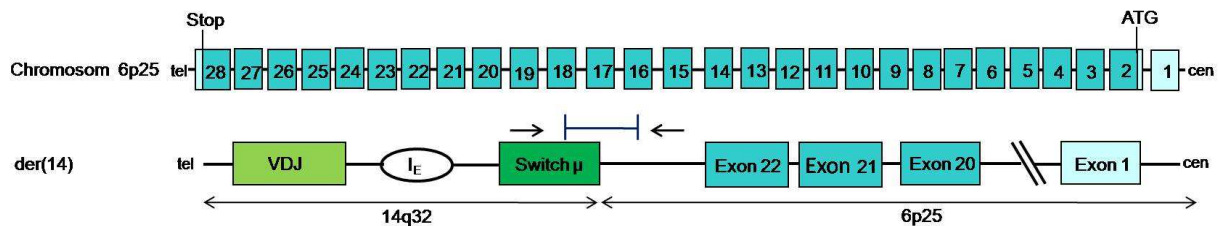


Abbildung 14: Schematische Darstellung der IgH/PVRL2-Translokation in Fall 19. In der oberen Hälfte ist die Keimbahnkonfiguration des EXOC2-Gens dargestellt. Das Gen umfasst 28 Exons, die kodierende Region beginnt in Exon 2 und endet in Exon 28. In der unteren Hälfte der Abbildung befindet sich das derivative Chromosom 14. Die Translokation verbindet die Switch μ -Region in Position 106325573 bp vom p-Terminus von Chromosom 14 mit Intron 22 des EXOC2-Gens in Position 537397 bp vom p-Terminus von Chromosom 6 (GRCh37/hg19). Die Translokation zerstört die kodierende Sequenz des EXOC2-Gens und die Transkriptionsrichtungen der jeweiligen Gene sind gegenläufig. Die schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsorte der Primer für die LD-PCR an. Die blaue Linie gibt den sequenzierten Bereich an. tel: Telomer. cen: Centromer. I_E: Intron Enhancer.

Das EXOC2-Protein ist Teil des Exocyst-Komplexes, der verantwortlich dafür ist, dass Vesikel zu speziellen Bindungsstellen an der Plasmamembran gelangen. Das Produkt der kodierenden Region des EXOC2-Gens, beginnend in Exon 2, umfasst 924 Aminosäuren. Das Transkriptionsprodukt von EXOC2 besitzt eine Länge von 20797 Basenpaaren. Die hier amplifizierte Translokation in Fall 20 führt zu einer gegenläufigen Transkriptionsrichtung der IgH-Region und des EXOC2-Gens, ein Fusionsprodukt ist somit nicht möglich.

Durch die Translokation wird außerdem die kodierende Region des EXOC2-Gens zerstört. Die Genexpressionsdaten in diesem Fall zeigten auch, dass EXOC2 keinen Unterschied in der Expression zu anderen untersuchten DLBCLs ohne diese Translokation aufwies. Bei einer Betrachtung der annotierten Gene im Bereich des EXOC2-Gens wurde der Fokus besonders auf das Gen IRF4 gerichtet, dass sich etwa 74 kb stromaufwärts von EXOC2 befindet (Abbildung 15).

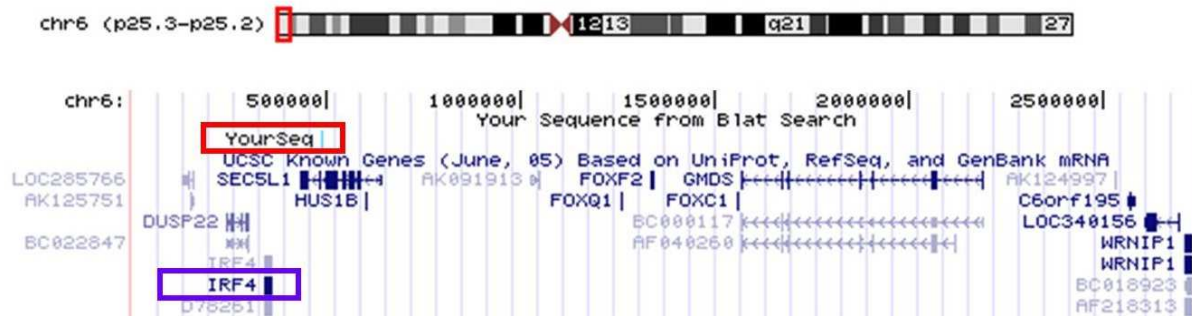


Abbildung 15: Ideogramm des Chromosom 6 mit einem Ausschnitt der annotierten Gene im Bereich 6p25.2. Die translozierte Sequenz wurde mit einem roten Rechteck unterlegt. Sie liegt direkt im Bereich des SEC5L1-Gens (Synonym für EXOC2). Stromaufwärts davon, etwa 74 kb entfernt, liegt das IRF4-Gen (violette Rechteck).

IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) wird auch als MUM1 (*Melanoma Associated Antigen (mutated) 1*) bezeichnet und ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die B-Zell-Entwicklung von entscheidender Bedeutung ist. FISH-Analysen der Kooperationspartner des MMML-Verbundes bestätigten diese Translokation und konnten mit speziellen IRF4-Sonden in 427 untersuchten B-Zell-Lymphomen weitere 19 DLBCL-Fälle identifizieren, die eine Ig/IRF4-Translokation aufweisen. Die Ig/IRF4-Translokation scheint also ein wiederkehrendes Ereignis in reifen B-Zell-Lymphomen zu sein.

4. Diskussion

4.1 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens TNFAIP3 (A20) in CLL

Trotz ihrer klinischen und biologischen Diversität ist die konstitutive NF- κ B Aktivität ein gemeinsames Charakteristikum der CLL-Zellen (Furman et al., 2000; Hewamana et al., 2008). In der CLL zeigt sich, dass die CLL-Zellen in den Proliferationszentren eine starke NF- κ B-Aktivität besitzen, was auf die Einflüsse der Mikroumgebung zurückgeführt wird (Herreros et al.).

Darüber hinaus wurde aber auch in den Blut-CLL-Zellen eine schwache konstitutive NF- κ B-Aktivität nachgewiesen. Dort wurden bislang aberrante Akkumulationen der Glycogen-Synthasekinase-3 im Zellkern und Signalgebung durch BAFF und APRIL als mögliche Mechanismen für die NF- κ B Aktivierung identifiziert (Kern et al., 2004; Endo et al., 2007; Ougolkov et al., 2007). Weiterhin wurden in einigen CLL-Fällen eine bi-allelische Deletion in Chromosom 14q32 gefunden, die unter anderem auch den TRAF3-Locus betreffen und damit diesen NF- κ B-Suppressor zerstören (Nagel et al., 2009). Ebenso könnten Mutationen eine Rolle in der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs spielen.

Da der NF- κ B-Signalweg für einen Stop der Apoptose und zum verbesserten Überleben der Zellen essentiell ist, gibt es bereits einige Strategien, Therapieansätze für die CLL zu finden, indem man diesen Signalweg inhibiert (Endo et al., 2007; Pickering et al., 2007). Gerade für solche Therapieansätze ist es wichtig, alle Faktoren zu kennen, die an der konstitutiven Ausprägung des NF- κ B-Signalweges in CLL-Zellen beteiligt sind.

Vor allem der klassische Signalweg ist für die konstitutive Ausprägung des NF- κ B in CLL verantwortlich (Furman et al., 2000; Endo et al., 2007; Pickering et al., 2007; Hewamana et al., 2008; Lopez-Guerra et al., 2009). Da mit dem TNFAIP3-Gen ein wichtiger Suppressor des klassischen NF- κ B-Signalwegs durch Mutationen in mehreren Lymphomen inaktiviert vorliegt (Compagno et al., 2009; Honma et al., 2009; Kato et al., 2009; Novak et al., 2009; Schmitz et al., 2009a; Chanudet et al., 2010), war es nahe liegend auch CLL-Fälle im Hinblick auf inaktivierende Mutationen oder Deletionen in TNFAIP3 zu analysieren.

Obwohl die Kollektion der hier untersuchten CLL, zwölf Fälle mit einer bestätigten Deletion eines Allels von TNFAIP3, und 32 weitere Fälle, von denen

wahrscheinlich die meisten ebenfalls eine solche Deletion besitzen, aufweist, wurden keine inaktivierenden Mutationen im TNFAIP3-Gen durch Sequenzanalysen gefunden (ebenso wenig, wie in den vier weiteren Fällen ohne Chromosom 6q21-23 Deletion). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also eindeutig, dass in CLL die Inaktivierung von TNFAIP3 durch Mutationen keine Rolle in der konstitutiven Aktivität des NF- κ B-Signalweges spielt.

Auch Promotormethylierungen, um den TNFAIP3-Locus still zu legen, wurden erst kürzlich in CLL ausgeschlossen, gleichzeitig wurden in der Studie die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit bestätigt, dass keine Mutationen in primären CLL-Fällen vorliegen (Frenzel et al., 2010).

Der Mechanismus der erhöhten NF- κ B-Aktivität in CLL-Zellen scheint also von dem anderer Lymphome mit konstitutiver NF- κ B-Aktivität abzuweichen und muss weiterhin identifiziert werden. Außerdem ist zu klären, welches Gen das pathogenetisch relevante Ziel der selteneren, aber doch wiederkehrenden Deletion in Chromosom 6q21-23 in CLL ist.

4.2 Mutationsanalyse von TRAF3 im klassischen Hodgkin Lymphom

Stimulierung der TNF-Rezeptoren führt zur Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges, der im cHL konstitutiv ausgeprägt wird. Diese konstitutive Aktivität ist essentiell für das Zellwachstum, die Proliferation und die Apoptose-Resistenz der HRS-Zellen (Bargou et al., 1997).

Die Mehrheit der cHL-Fälle ist dadurch charakterisiert, dass sie Proteine der TNFR-Superfamilie, wie TNF-R1, TNF-R2, CD30, CD40 und Fas exprimieren (Küppers, 2009b). TNF-R2, CD30 und CD40 besitzen TRAF-Bindemotive, welche die intrazellulären Signale über eine Interaktion mit den TRAF-Proteinen vermitteln. Ungefähr 40% der cHL-Fälle sind außerdem mit EBV assoziiert, deren HRS-Zellen das EBV-Protein LMP1 exprimieren. LMP1 besitzt ebenfalls TRAF-Bindedomänen und benutzt TRAF-Proteine in einigen Aspekten seiner Signalübermittlung (Herbst et al., 1991; Pallesen et al., 1991; Devergne et al., 1996; Devergne et al., 1998).

Während die meisten Mitglieder der TRAF-Proteinfamilie wie TRAF1, 2, 5 und 6 eine aktivierende Wirkung auf den NF- κ B-Signalweg haben, so besitzt TRAF3 eine inhibierende Funktion. Eine Überexpression der aktivierenden TRAF-Faktoren trägt in cHL zur Ausprägung des NF- κ B-Signalweges bei (Horie et al., 2002a; Guo et al.,

2009), aber es war bislang nicht bekannt, ob eine Inaktivierung von TRAF3 ebenfalls eine der Ursachen für die konstitutive Aktivität des NF- κ B-Signalweges ist.

Frühere Studien zeigen, dass die in diesen Studien untersuchten cHL-Zelllinien KM-H2 und L-428 weder die TRAF3-mRNA noch das TRAF3-Protein exprimieren (Izban et al., 2000; Guo et al., 2009).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorliegenden Mutationsanalyse zeigt, dass weder in der Zelllinie KM-H2 noch in der L-428-Zelllinie Mutationen oder kleinere Deletionen im TRAF3-Gen vorhanden waren, womit die Inaktivierung des Gens durch genetische Läsionen als Ursache für die fehlende Expression von TRAF3 in den beiden Zelllinien ausgeschlossen werden kann. Dafür könnten eventuell andere Mechanismen für die Inaktivierung des TRAF3-Gens verantwortlich sein, wie z. B. die epigenetische Stilllegung des TRAF3-Locus.

Von allen auf Mutationen untersuchten cHL-Zelllinien zeigte sich nur in der U-HO1-Zelllinie eine inaktivierende Deletion des TRAF3-Gens. Interessanterweise wurden in dieser Zelllinie bereits Mutationen des TNFAIP3-Gens gefunden, so dass in U-HO1 mindestens zwei negative Regulatoren des NF- κ B-Signalweges inaktiviert sind. Ähnliche Situationen liegen auch in der L-428-Zelllinie vor, in der NFKBIA und NFKBIE mutiert sind, oder in der Zelllinie KM-H2, die Mutationen in NFKBIA, CYLD und TNFAIP3 besitzt (Schmidt et al., ; Emmerich et al., 1999; Jungnickel et al., 2000; Emmerich et al., 2003; Schmitz et al., 2009a).

Diese Arbeit unterstützt also die Annahme, dass mehr als ein NF- κ B-Regulator durch genetische Läsionen in HRS-Zellen betroffen ist. Dies kann darauf hindeuten, dass eine einzelne Aberration im NF- κ B-Signalweg nicht ausreicht, um eine so starke Aktivität dieses Signalweges zu erreichen, um das Überleben der HRS-Zellen zu garantieren. Die negativen Befunde in der Mutationsanalyse der sieben cHL-Primärfälle müssen nicht zwangsläufig bedeuten, dass genetische Läsionen im TRAF3-Gen wie in der U-HO1-Zelllinie, für alle cHL-Fälle völlig ausgeschlossen werden können. Viele der bereits bekannten Läsionen, wie z. B. Mutationen in NFKBIA, NFKBIE, TNFAIP3, SOCS1 oder Zugewinne in REL, BCL3 und JAK2, wurden ursprünglich in cHL-Zelllinien identifiziert und später erst mit geringerer Frequenz auch in Primärfällen entdeckt (Lake et al., 2009; Schmitz et al., 2009a; Schmitz et al., 2009b).

4.3 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner des MYC-Proto-Onkogens in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL)

Chromosomale Translokationen, die den Ig-Locus und das MYC-Gen miteinander verbinden, wurden ausgiebig im BL und in Nicht-BL beschrieben, aber Daten über MYC-Translokationen mit Nicht-Ig-Partnern sind eher selten.

In dieser Arbeit wurden 13 B-NHLs mit Hilfe der MYC-LDI-PCR untersucht, die MYC-Translokationen mit unbekannten Translokationspartnern aufwiesen. Das von den 13 Fällen nur in einem Fall eine Translokation amplifiziert werden konnte, liegt an den limitierenden Eigenschaften der LDI-PCR. Die verwendete rTth-Polymerase ist in der Lage, Produkte bis zu einer maximalen Größe von ca. 10 kb zu amplifizieren, wenn also die Restriktionsschnittstelle im Partnergen weit hinter dem Bruchpunkt liegt, so ist eine Amplifikation nicht möglich. Zudem wurde bei MYC-Translokationen beschrieben, dass die Bruchpunkte einer solchen Translokation teilweise bis zu 1 Mb weit verteilt um den MYC-Locus herum vorkommen können (Joos et al., 1992; Zeidler et al., 1994; Bertrand et al., 2007). Wenn der MYC-Bruchpunkt zu weit von der für die LDI-PCR ausgewählten Stelle liegt ist auch hier keine Amplifikation mehr möglich.

Die Translokation in Fall 4 (MPI-Nummer 248) verbindet das Tumorsuppressorgen SOCS1 mit dem Onkogen MYC. Die kodierenden Sequenzen beider Gene bleiben durch die Translokation unversehrt. Als Konsequenz einer Translokation kann ein Fusionsprodukt entstehen und/oder es kommt zur Deregulierung der Genexpression.

In Fall 4 liegen das MYC-Gen und das Partnergen SOCS1 in der gleichen transkriptionellen Orientierung vor, so dass ein Fusionsprodukt theoretisch möglich wäre. Allerdings liegt der Bruchpunkt der Translokation genau in Exon 1 des MYC-Gens (Abbildung 9), womit die 3'-Spleißstelle dieses Exons verloren geht. Ob das Spleißen von Exon 1 des MYC-Gens mit dem kodierenden Exon 2 von SOCS1 durch eine alternative Spleißstelle auf dem derivativen Chromosom 8 (Abbildung 9B) stattfinden kann, wurde bis jetzt nicht untersucht. Auf dem reziproken Part der Translokation, dem derivativen Chromosom 16 (Abbildung 9C), konnte die Bildung eines Fusionstranskriptes ebenfalls noch nicht gezeigt werden. Die verbliebene Sequenz des Exons 1 des MYC-Gens umfasst hier die 3'-Spleißstelle, aber nicht die 5'-Spleißstelle. Es bestehen daher zwei Möglichkeiten: Einerseits, könnte durch eine alternative Spleißstelle das Exon 1 des SOCS1-Gens mit dem Exon 1 des MYC-

Gens verknüpft werden, andererseits kann das Exon 1 von MYC beim Spleißen der prä-mRNA entfernt werden und Exon 1 des SOCS1-Gens sich direkt mit dem Exon 2 des MYC-Gens verbinden.

Die 577 bp große Deletion im 5'-regulatorischen Bereich des SOCS1-Gens (Abbildung 9C) könnte die Bildung eines Transkripts vielleicht erschweren, da Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren STAT3 und Rel A von der Deletion betroffen sind (SABiosciences). Die Möglichkeit der deregulierten Expression des MYC-Gens durch den SOCS1-Promotor ist deshalb unwahrscheinlich.

Die Expressionsdaten des MYC- und SOCS1-Gen zeigen, dass beide Gene in Fall 4 ausgeprägt werden und dass weder eine erhöhte Expression von MYC noch eine Herunterregulierung von SOCS1 in Fall 4 im Vergleich zu 15 anderen Fällen des gesamten Kollektivs ohne diese Translokation vorliegen. (Verglichen wurde die Genexpression mit Fällen, die entweder eine Ig/MYC-Translokation oder keine MYC-Translokation aufwiesen.) Eine Überexpression von MYC, genauso wie eine Inaktivierung von SOCS1, scheint also nicht vorzuliegen. Ob die vorhandene Expression des SOCS1-Gens von dem anderen nicht-translozierten Allel stammt, oder ob das andere Allel des Tumorsuppressors durch Mutationen oder Deletionen in Fall 4 inaktiviert vorliegt, müssen spätere Studien, z. B. durch eine Mutationsanalyse des SOCS 1-Gens zeigen.

Bislang konnte also noch nicht geklärt werden, ob das MYC-Gen durch diese Translokation dereguliert wird, oder ob das eigentliche Zielgen dieser Translokation noch nicht identifiziert werden konnte.

Auffällig ist, dass von den 13 untersuchten Fällen mit MYC-Translokation und unbekanntem Partnergen nur zwei Fälle als molekulare BL identifiziert wurden, die restlichen Fälle wurden als intermediäre- oder nicht-molekulare BL eingestuft. Eine frühere Beobachtung (Bertrand et al., 2007) bestätigt, dass die Ig/MYC-Translokation weiterhin ein klassisches Merkmal des BL ist und MYC-Translokationen mit anderen Partnergenen doch eher mit Genexpressionsprofilen, die sich von der molekularen Signatur des BL unterscheiden, assoziiert sind.

4.4 Klonierung und Charakterisierung unbekannter Translokationspartner der Immunglobulin-Schwerketten (IgH) Region in B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen (B-NHL)

Translokationen, die den Ig-Locus betreffen, sind wichtige Faktoren in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen. Durch die vielen Besonderheiten in der B-Zell-Entwicklung, die mit Doppelstrangbrüchen assoziiert sind, wie VDJ-Rekombination, CSR und SHM, ist die Gefahr der Entstehung von Translokationen besonders groß. In der Regel werden bei B-Zell-Lymphomen Onkogene durch solche Translokationen dereguliert, so dass die Entdeckung von bestimmten Translokationen auch oft mit der Entdeckung eines neuen Onkogens verbunden war.

FISH-Analysen mit Sonden in den Ig-Regionen eignen sich besonders, um Bruchereignisse festzustellen und einzugrenzen, sie haben aber den Nachteil, dass man ein unbekanntes transloziertes Chromosom damit nicht identifiziert.

Mit der Methode der LDI-PCR wird es möglich, einen unbekannten Partner direkt zu bestimmen und den Bruchpunkt zu charakterisieren. Der limitierende Faktor der LDI-PCR ist allerdings die Länge des zu amplifizierenden Fragments. Sollte eine Restriktionsschnittstelle im Partnerchromosom weit hinter dem Bruchpunkt liegen, so ist eine Amplifikation in der LDI-PCR nicht mehr möglich.

Dies kann mit als Grund angesehen werden, dass von den in dieser Arbeit untersuchten 28 Fällen mit in der FISH-Analyse gezeigtem IgH-Split und unbekanntem Partnerchromosom nur in sieben Fällen eine Translokation amplifiziert werden konnte. Weitere Gründe dafür sind aber auch, dass Switch epsilon assoziierte Translokationen mit keinem der LDI-PCR-Ansätze detektiert werden konnten oder das ein Auftreten von Punktmutationen in den Primerbindungsstellen eine erfolgreiche LDI-PCR verhindern kann.

4.4.1 Translokation t(7;14)(q31;q32) in Fall 10 (MPI-Nummer 108)

Das von der Translokation betroffene IMMP2L-Gen in Fall 10 ist ein Homolog des Hefe Imp2p (*Inner membrane peptidase 2*)-Gens. Der IMP (*Mitochondrial inner membrane peptidase*)-Komplex in Hefe besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten Imp1p (*Inner membrane peptidase 1*) und Imp2p und aus dem Protein Som1 (Behrens et al., 1991; Schneider et al., 1991; Nunnari et al., 1993; Jan et al., 2000).

Dieser Komplex generiert reife, aktive Proteine im Zwischenmembranraum der Mitochondrien durch proteolytische Abspaltung der Zielsequenzen der im Kern kodierten Proteine (Burri et al., 2005).

Das 175 Aminosäuren umfassende IMMP2L-Protein ist zu 41% identisch mit dem Hefeprotein und zu 90% identisch mit dem Mausprotein. Burri et al. zeigte auch, dass der IMP-Komplex in Mäusen für die Reifung und Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Diablo wichtig ist (Burri et al., 2005).

Das IMMP2L-Protein in Menschen scheint in neuropsychiatrischen Erkrankungen wie dem Tourette-Syndrom oder Autismus eine Rolle zu spielen (Petek et al., 2001; Petek et al., 2007), ein Zusammenhang mit Krebserkrankungen wurde für IMMP2L aber bislang nicht gefunden.

Durch die Zerstörung des IMMP2L-Gens durch die Translokation und das Auftreten der CFS FRA7K im Bereich des IMMP2L-Gens, wurde in dieser Arbeit die Vermutung aufgestellt, dass IMMP2L vielleicht eine bislang unbekannte Wirkung als Tumorsuppressor haben könnte, da CFS oft in Regionen von Tumorsuppressoren vorliegen (Arlt et al., 2006; McAvoy et al., 2007) und das Hefe-Homolog Imp2p für die Aktivierung eines pro-apoptotischen Faktors von Bedeutung ist (Burri et al., 2005). Bei Tumorsuppressoren liegt häufig die Inaktivierung beider Allele vor, eine Mutationsanalyse des anderen Allels konnte aber keine inaktivierenden Mutationen oder Deletionen in der kodierenden Region von IMMP2L feststellen, was aber nicht bedeuten muss, dass das untranslozierte Allel aktiv vorliegt. Eine epigenetische Stilllegung des Locus ist nicht ausgeschlossen, außerdem wurde bislang noch keine Mutationsanalyse des Promotors, Enhancers und anderer regulatorischer Einheiten des IMMP2L-Gens in diesem Fall durchgeführt. Über das Vorhandensein des Mechanismus der Haploinsuffizienz ist bei dem Gen IMMP2L aber nichts bekannt.

Da keine Expressionsdaten über dieses Gen zur Verfügung standen, war bei Abschluss dieser Arbeit unklar, ob IMMP2L überhaupt in diesem Fall oder in anderen Fällen exprimiert wird und ob Veränderungen in der Expression dieses Gens durch die Translokation auftreten. Dies müsste durch weitere Untersuchungen, wie z .B. einer *Real-Time*-quantitativen-PCR oder dem Nachweis des Proteins durch einen Western Blot noch erfolgen.

Zur Zeit scheint diese Translokation ein einmaliges Ereignis in den untersuchten NHL-Fällen zu sein, wahrscheinlich liegt ein sekundäres Ereignis in der Pathogenese

dieses Falles vor. Weiterhin gibt es noch die Möglichkeit, dass das eigentliche Zielgen dieser Translokation bislang noch nicht identifiziert wurde.

4.4.2 Translokation t(1;14)(p13;q32) im Fall 17 (MPI-Nummer 164)

Das von dem Bruchpunkt der Translokation in Fall 17 betroffene BCAS2 wurde ursprünglich als Gen identifiziert, das in einigen Brustkrebszelllinien und in zwei von 60 Primärtumoren amplifiziert und überexprimiert war (Nagasaki et al., 1999; Maass et al., 2002). Bei der Pathogenese des Brustkrebses spielt BCAS2 wahrscheinlich eine wichtige Rolle in seiner Funktion als transkriptioneller Kofaktor des Östrogenrezeptors, der die Östrogenrezeptorvermittelte Genexpression weiter verstärkt (Qi et al., 2005).

Vor kurzem wurde außerdem gezeigt, dass BCAS2 ein negativer Regulator des Tumorsuppressorgens p53 ist (Kuo et al., 2009). Diese Studien zeigen, dass BCAS2 damit eine onkogene Wirkung besitzt.

Die Translokation in dem vorliegenden Fall dieser Arbeit zerstört die kodierende Region des BCAS2-Gens und die *Head-to-Head*-Ausrichtung des BCAS2-Gens und des Ig-Locus spricht gegen ein Fusionstranskript. Die Genexpressionsdaten von BCAS2 in diesem Fall zeigen keine Veränderung im Vergleich mit anderen Fällen ohne diese Translokation. Damit scheint BCAS2 in Fall 17 nicht als neues Onkogen in Frage zu kommen.

Weitere Studien zeigen, dass BCAS2 in der Reparatur von DNA-Schädigungen beteiligt ist und Teil des Spleißosoms sein könnte (Neubauer et al., 1998; Kuo et al., 2009). Ob die Translokation des BCAS2-Gens deshalb Auswirkungen auf das RNA-Spleißen oder die DNA-Reparatur in diesem Fall haben könnte, müsste noch geklärt werden. Andere potentielle Zielgene dieser Translokation konnten bislang nicht identifiziert werden.

Weiterhin stellt auch diese Translokation bislang ein einmaliges und möglicherweise sekundäres Ereignis dar.

4.4.3 Translokation t(14;19)(q32;q13) in Fall 19 (MPI-Nummer 186)

Das PVRL2-Gen gehört zur Nectin-Familie, die in Zelladhäsionsprozesse und in der Regulation der intrazellulären Funktionen durch Signaltransduktion beteiligt ist (Graf et al., 2005). Eine Studie zeigte, dass dieses Gen wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie durch die Beeinflussung intrazellulärer Interaktionen zwischen den malignen und immunreaktiven Zellen spielt (Graf et al., 2005). In drei Fällen mit peripherem T-Zell-Lymphom wurde PVRL2 als Translokationspartner des T-Zell-Rezeptors identifiziert. In diesen Fällen wurde eine fast 30mal höhere Expression des PVRL2-Gens (verglichen mit Kontrollen) festgestellt (Almire et al., 2007). Die präzise Rolle des PVRL2-Gens in der Pathogenese dieser T-Zell-Lymphome wurde aber bislang noch nicht geklärt.

Auch in dem dieser Arbeit vorliegenden Ergebnis wurde eine leichte Erhöhung der Expression des PVRL2-Gens in Fall 19, verglichen mit anderen Fällen ohne diese Translokation, beobachtet. Da die hier amplifizierte Translokation nur einen kleinen Bereich der 5'-untranslatierten Region des PVRL2-Gens mit dem IgH-Locus verbindet und nicht die kodierende Sequenz, steht die kodierende Sequenz des PVRL2-Gens nicht unter der Kontrolle des 5'-IgH-Promotors und des Intron-Enhancers. Bislang war es nicht möglich, trotz des Versuches einer direkten PCR und 5'RACE, den reziproken Bruchpunkt dieser Translokation zu identifizieren. Normalerweise sind Switch-assoziierte Translokationen direkt reziprok und betreffen meist nur eine Switch-Region, vor allem bei Switch μ -assoziierten Translokationen (Küppers und Dalla-Favera, 2001). Sollte dies auch für die Translokation in Fall 19 zutreffen, so wäre die kodierende Sequenz des PVRL2-Gens mit dem *downstream* Switch μ -Locus verknüpft.

Es wäre denkbar, dass die 3'Enhancer des Ig-Locus und die Keimbahn-Promotoren, die sich vor jeder Switch-Region befinden, die regulatorische Kontrolle über das PVRL2-Gen übernehmen und dessen Expression deregulieren. Die Ausrichtung des PVRL2-Gens und die des *downstream* IgH-Bereichs weisen allerdings eine gegenläufige Transkriptionsrichtung auf, was ein eventuelles Fusionsprodukt ausschließt. Wie der tatsächliche reziproke Bruchpunkt beschaffen ist und wie es zu der erhöhten Expression des PVRL2-Gens in Fall 19 kommt, muss noch untersucht werden.

Ein weiteres interessantes Gen etwa 81 kb stromaufwärts des PVRL2-Gens ist BCL3. In früheren Studien, vor allem in B-CLL und vereinzelt in verschiedenen

anderen B-Zell-Lymphomen, wurde eine Translokation identifiziert, die den IgH-Locus mit BCL3 verknüpft (McKeithan et al., 1997; Michaux et al., 1997; Martin-Subero et al., 2006; Akasaka et al., 2007). BCL3 ist ein Proto-Onkogen und Mitglied der I κ B-Familie, die in die Regulation der NF- κ B Transkriptionsfaktoren involviert ist. Als Resultat der IgH/BCL3-Translokation wird das BCL3-Gen hochreguliert. Auch die Studie von Almire et al. zeigte, dass neben der Hochregulierung des PVRL2-Gens in den von der Translokation betroffenen T-Zell-Lymphomen auch BCL3 leicht hochreguliert wurde ((Almire et al., 2007).

Die Genexpressionsdaten in Fall 19 zeigen jedoch keine Veränderung in der Expression von BCL3, was bedeutet, dass in der vorliegenden Translokation das BCL3-Gen wahrscheinlich nicht das betroffene Ziel einer deregulierten Ausprägung ist. Auch die anderen untersuchten Gene in der Umgebung des PVRL2-Locus zeigten keine veränderte Ausprägung, darunter auch die Gene CEBPA, CEBPG und SPIB, die in anderen Studien als Translokationspartner einer t(14;19) identifiziert wurden (Robinson et al., 2004; Chapiro et al., 2006; Akasaka et al., 2007; Lenz et al., 2007). Zusammenfassend kann über diesen Fall gesagt werden, dass PVRL2 wahrscheinlich das Zielgen dieser Translokation ist, der Mechanismus aber noch genau zu identifizieren bleibt. Trotzdem ist diese Translokation, die genau das PVRL2-Gen betrifft, ein bislang einmaliges Ereignis in aggressiven B-NHLs. Allerdings ist es neben dem ALK-Gen auch eines der wenigen Beispiele, in denen der gleiche Bruchpunkt in T- sowie in einem B-Zell-Lymphom identifiziert werden konnte.

4.4.4 Translokation t(6;14)(p25;q32) in Fall 20 (MPI-Nummer 233)

In dieser Arbeit wurde in Fall 20 eine Translokation identifiziert, die das EXOC2-Gen mit der IgH-Region verknüpft. Dabei wird die kodierende Sequenz des EXOC2-Gens zerstört. Etwa 74 kb in Richtung Telomer liegt das IRF4-Gen, das dieselbe transkriptionelle Orientierung wie der IgH-Locus aufweist. Translokationen, die das IRF4-Gen mit der IgH-Region verknüpfen und zu einer Deregulierung der IRF4 Expression führen, wurden schon im multiplen Myelom beschrieben (Yoshida et al., 1999). Die FISH-Analysen einer MMML-Kooperationsgruppe in mehr als 400 B-Zell-Lymphomen entdeckten 19 weitere Fälle mit Ig/IRF4-Translokationen. Insgesamt wurden so 17 Fälle mit IgH/IRF4, zwei mit Ig λ /IRF4 und einer mit Ig κ /IRF4-

Translokationen identifiziert. Damit wurde IRF4 als potentielles Zielgen der Translokation bestätigt und weiter analysiert.

Untersuchungen der verschiedenen Kooperationspartner des MMML-Verbundes ergaben, dass die Fälle mit Ig/IRF4-Fusionen vor allem DLBCL vom GCB-Typ oder Follikuläre Lymphome Grad 3 sind, eine starke IRF4 und BCL6 Expression aufweisen und keine PRDM1/BLIMP1 Expression oder Ig/BCL2-Brüche besitzen.

Unter physiologischen Bedingungen unterdrückt IRF4 die Expression von BCL6 und aktiviert PRDM1/BLIMP1. In den Ig/IRF4-positiven Fällen gab es keine Anzeichen für eine Inaktivierung von PRDM1/BLIMP1, aber dafür BCL6 assoziierte Translokationen, Mutationen im BCL6-Gen und in einem Fall sogar einen Zugewinn von BCL6. Diese genomischen Aberrationen sind eine Möglichkeit, mit der BCL6 wahrscheinlich der Suppression durch IRF4 entgehen kann.

Auffallend an Fall 20 war von Anfang an, dass es sich hierbei um einen der selteneren pädiatrischen DLBCL-Fälle handelt. Unter den 385 Fällen, die durch die MMML-Kooperationspartner mit FISH-Analysen untersucht wurden und über die verwertbare Patientendaten vorlagen, traten die Ig/IRF4-positiven Fälle häufiger bei Kindern (unter 18 Jahren) als bei Erwachsenen (über 18 Jahren) auf (15% versus 2%; $P < 0,001$).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass IRF4-Translokationen eine primäre genetische Veränderung in einem neuen Typ der GCB-Lymphome sind (I.Salaverria 2010; eingereicht).

4.5 Bewertung und Ausblick

Ziel der Arbeit war die Analyse verschiedener genetischer Läsionen, wie Mutationen und Translokationen, um weitere bisher noch unbekannte Onkogene zu identifizieren oder die Rolle verschiedener Tumorsuppressoren in der Pathogenese bestimmter Lymphome zu klären. Die hier erzielten Ergebnisse der Translokationen können zwar nicht direkt Aufschluss über ein bislang noch nicht beschriebenes Onkogen geben, die Suche nach potentiellen neuen und interessanten Kandidaten war jedoch erfolgreich. Weitere Erkenntnisse über die hier vorgestellten Translokationen ließen sich jetzt durch die Durchführung funktioneller Studien gewinnen.

Indem man gezielt Gene, die potentielle Zielgene der Translokationen darstellen, in einem geeigneten Modellsystem, wie der Zellkultur, entweder herunterreguliert (z.

B. durch den Einsatz von siRNA) oder überexprimiert, lassen sich Aussagen über die Funktion des Gens z. B. für das Überleben der Tumorzellen machen.

Die LDI-PCR stellte in dieser Arbeit eine einfache, stabile und elegante Methode dar, Bruchpunkte direkt zu charakterisieren. Allerdings ist die Anwendung mehrerer LDI-PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass sich eine Restriktionserkennungsstelle im unbekannten Partnerchromosom in einer Entfernung vom Bruchpunkt befindet, in dem die Amplifikation noch möglich ist, auch sehr zeitintensiv. Deshalb würde mittlerweile der Einsatz neuerer Sequenziertechniken, des *Next-Generation-Sequencing*, für die Mutationsanalyse sowie für die Identifizierung von Translokationen in Betracht gezogen werden. Durch die Möglichkeit, Millionen von Reaktionen parallel ablaufen zu lassen, ist diese Technologie in der Lage, eine große Menge an sequenzierten Daten zu liefern. Vor allem für die Identifizierung von Translokationen stellt die paired-end-Sequenzierung einen enormen Vorteil dar, da sie nicht nur strukturelle Rekombinationen im Genom, sondern auch Fusionsgene im Transkriptom entdecken kann (Korbel et al., 2007; Ruan et al., 2007).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Vielfalt genetischer Läsionen und über die unterschiedlichen Mechanismen der deregulierten NF- κ B-Ausprägung in den verschiedenen B-NHLs und dem cHL gewonnen werden. Durch die Abwesenheit inaktivierender Mutationen im TNFAIP3-Gen konnte gezeigt werden, dass dieses Gen bei der konstitutiven Ausprägung des NF- κ B-Signalweges im Gegensatz zu vielen verschiedenen anderen Lymphomen in CLL-Zellen keine Rolle spielt. Die Vermutung, dass TNFAIP3 das Zielgen der selteneren 6q Deletion in einigen CLL-Fällen ist, wurde also widerlegt. Der Befund, dass TRAF3 nur in einer cHL-Zelllinie durch eine Deletion inaktiviert wurde und in allen weiteren Zelllinien und in den sieben Primärfällen nicht von inaktivierenden Mutationen oder Deletionen betroffen ist, demonstriert, dass die TRAF3-Inaktivierung in der Regel nicht zur konstitutiven Ausprägung des NF- κ B-Signalwegs in HRS-Zellen beiträgt, sondern eher ein seltenes Ereignis darstellt. Weiterhin wurde mit zwei in dieser Arbeit etablierten MYC-LDI-PCR-Ansätzen in einem von 13 Fällen das bislang in MYC-Translokationen unbeschriebene Partnergen SOCS1 identifiziert. Da SOCS1 ein bekannter Tumorsuppressor ist, ist die Fusion des Onkogens MYC mit einem Tumorsuppressor besonders interessant. Der Mechanismus, der aufgrund dieser Translokation auf die beiden Gene wirkt, muss aber noch geklärt werden. In dieser Arbeit konnten in sieben von 28 B-NHL-Fällen mit Hilfe zum Teil neu etablierter LDI-PCR-Ansätze IgH-assoziierte Translokationen amplifiziert und sequenziert werden. Vier dieser Translokationen stellten sich als bislang noch völlig unbeschriebene Partner einer solchen Translokation in DLBCL heraus. In der überwiegenden Mehrheit dieser Translokationen wurde die kodierende Sequenz zerstört. Es bleibt noch zu überprüfen, ob dadurch ein bislang noch unbekannter Tumorsuppressor inaktiviert wird oder ein entfernt liegendes bis jetzt noch nicht identifiziertes Onkogen dereguliert wird. In einem Fall konnte allerdings das IRF4-Gen als beteiligtes Onkogen erkannt werden, was zur Charakterisierung einer neuen Untergruppe des GCB-DLBCL führte. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen also nicht nur, dass DLBCL ein weitaus heterogeneres Lymphom ist, als bislang angenommen, sondern bieten mit der Identifizierung des PVRL2-Gens auch ein weiteres Beispiel dafür, dass in B- und T-Zell-Lymphomen die gleichen Bruchpunkte in Translokationen betroffen sein können.

6. Literatur

- Akasaka, H., Akasaka, T., Kurata, M., Ueda, C., Shimizu, A., Uchiyama, T. and Ohno, H.: Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res* 60 (2000) 2335-41.
- Akasaka, T., Balasas, T., Russell, L.J., Sugimoto, K.J., Majid, A., Walewska, R., Karran, E.L., Brown, D.G., Cain, K., Harder, L., Gesk, S., Martin-Subero, J.I., Atherton, M.G., Bruggemann, M., Calasanz, M.J., Davies, T., Haas, O.A., Hagemeijer, A., Kempinski, H., Lessard, M., Lillington, D.M., Moore, S., Nguyen-Khac, F., Radford-Weiss, I., Schoch, C., Struski, S., Talley, P., Welham, M.J., Worley, H., Strefford, J.C., Harrison, C.J., Siebert, R. and Dyer, M.J.: Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood* 109 (2007) 3451-61.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O. and Staudt, L.M.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 (2000) 503-11.
- Allen, C.D., Okada, T., Tang, H.L. and Cyster, J.G.: Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315 (2007) 528-31.
- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R.R., Selvaggi, T., Kehry, M.R. and Staudt, L.M.: BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87 (1996) 5257-68.
- Almire, C., Bertrand, P., Ruminy, P., Maingonnat, C., Wlodarska, I., Martin-Subero, J.I., Siebert, R., Tilly, H. and Bastard, C.: PVRL2 is translocated to the TRA@ locus in t(14;19)(q11;q13)-positive peripheral T-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 46 (2007) 1011-8.
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E.M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D.R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Jr., Kuehl, W.M. and Staudt, L.M.: Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12 (2007) 115-30.
- Arlt, M.F., Durkin, S.G., Ragland, R.L. and Glover, T.W.: Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 1126-35.
- Au, W.Y., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., Viswanatha, D.S., Klasa, R.J. and Connors, J.M.: The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leuk Lymphoma* 45 (2004) 519-28.
- Bahler, D.W. and Levy, R.: Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 6770-4.
- Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C. and Dorken, B.: Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100 (1997) 2961-9.
- Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M.Y., Bommert, K., Royer, H.D., Scheidereit, C. and Dorken, B.: High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 87 (1996) 4340-7.
- Behrens, M., Michaelis, G. and Pratje, E.: Mitochondrial inner membrane protease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *Escherichia coli* leader peptidase. *Mol Gen Genet* 228 (1991) 167-76.
- Bende, R.J., Smit, L.A. and van Noesel, C.J.: Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21 (2007) 18-29.
- Bertrand, P., Bastard, C., Maingonnat, C., Jardin, F., Maisonneuve, C., Courel, M.N., Ruminy, P., Picquenot, J.M. and Tilly, H.: Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia* 21 (2007) 515-23.
- Bosch, F., Jares, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Piris, M.A., Villamor, N., Tassies, D., Jaffe, E.S., Montserrat, E., Rozman, C. and et al.: PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 84 (1994) 2726-32.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F. and Alt, F.W.: Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int Immunol* 10 (1998) 799-806.
- Braeuninger, A., Kuppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.H., Rajewsky, K. and Hansmann, M.L.: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent

- clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 9337-42.
- Braeuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renne, C., Hansmann, M.L. and Küppers, R.: Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 118 (2006) 1853-61.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D. and Goodman, M.F.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 4102-7.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K. and Jacobs, H.: DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 13 (2000) 589-97.
- Brune, V., Tiacci, E., Pfeil, I., Doring, C., Eckerle, S., van Noesel, C.J., Klapper, W., Falini, B., von Heydebreck, A., Metzler, D., Brauning, A., Hansmann, M.L. and Küppers, R.: Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med* 205 (2008) 2251-68.
- Burri, L., Strahm, Y., Hawkins, C.J., Gentle, I.E., Puryer, M.A., Verhagen, A., Callus, B., Vaux, D. and Lithgow, T.: Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* 16 (2005) 2926-33.
- Butler, M.P., Iida, S., Capello, D., Rossi, D., Rao, P.H., Nallasivam, P., Louie, D.C., Chaganti, S., Au, T., Gascoyne, R.D., Gaidano, G., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R.: Alternative translocation breakpoint cluster region 5' to BCL-6 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 62 (2002) 4089-94.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F. and Hay, R.T.: Mutations in the Ikb α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for Ikb α . *Oncogene* 18 (1999) 3063-70.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 15524-9.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gruss, H.J. and Pinto, A.: CD40 antigen expression on Reed-Sternberg cells. A reliable diagnostic tool for Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 146 (1995a) 780-1.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gruss, H.J. and Pinto, A.: CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 147 (1995b) 912-22.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R.: BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86 (1995) 45-53.
- Chanudet, E., Huang, Y., Ichimura, K., Dong, G., Hamoudi, R.A., Radford, J., Wotherspoon, A.C., Isaacson, P.G., Ferry, J. and Du, M.Q.: A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. *Leukemia* 24 (2010) 483-7.
- Chapiro, E., Russell, L., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Lessard, M., Struski, S., Cave, H., Fert-Ferrer, S., Barin, C., Maarek, O., Della-Valle, V., Strefford, J.C., Berger, R., Harrison, C.J., Bernard, O.A. and Nguyen-Khac, F.: Overexpression of CEBPA resulting from the translocation t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 108 (2006) 3560-3.
- Chapman, C.J., Wright, D. and Stevenson, F.K.: Insight into Burkitt's lymphoma from immunoglobulin variable region gene analysis. *Leuk Lymphoma* 30 (1998) 257-67.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. and Alt, F.W.: Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422 (2003) 726-30.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 13944-9.
- Cohen, J.H., Revillard, J.P., Magaud, J.P., Lenoir, G., Vuillaume, M., Manel, A.M., Vincent, C. and Bryon, P.A.: B-cell maturation stages of Burkitt's lymphoma cell lines according to Epstein-Barr virus status and type of chromosome translocation. *J Natl Cancer Inst* 78 (1987) 235-42.
- Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R. and Pasqualucci, L.: Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459 (2009) 717-21.

- Copie-Bergman, C., Gaulard, P., Maouche-Chretien, L., Briere, J., Haioun, C., Alonso, M.A., Romeo, P.H. and Leroy, K.: The MAL gene is expressed in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 94 (1999) 3567-75.
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E. and Montserrat, E.: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348 (2003) 1764-75.
- Cuni, S., Perez-Aciego, P., Perez-Chacon, G., Vargas, J.A., Sanchez, A., Martin-Saavedra, F.M., Ballester, S., Garcia-Marco, J., Jorda, J. and Durantez, A.: A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 18 (2004) 1391-400.
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M. and Chiorazzi, N.: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94 (1999) 1840-7.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U. and Staudt, L.M.: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194 (2001) 1861-74.
- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Kluin-Nelemans, H.C., Kluin, P.M. and Schuurin, E.: Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 10 (1995) 1833-40.
- Devergne, O., Cahir McFarland, E.D., Mosialos, G., Izumi, K.M., Ware, C.F. and Kieff, E.: Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 72 (1998) 7900-8.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E. and Mosialos, G.: Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 7098-108.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E. and Papavasiliou, F.N.: AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med* 197 (2003) 1291-6.
- Drexler, H.G.: Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* 9 (1993) 1-25.
- Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G. and Chen, Z.J.: Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22 (2006) 245-57.
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H. and Dorken, B.: Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94 (1999) 3129-34.
- Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haeflker, A., Vry, M.S., Dohner, K., Bommert, K., Stein, H. and Dorken, B.: Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 201 (2003) 413-20.
- Endo, T., Nishio, M., Enzler, T., Cottam, H.B., Fukuda, T., James, D.F., Karin, M. and Kipps, T.J.: BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* 109 (2007) 703-10.
- Fabris, S., Storlazzi, C.T., Baldini, L., Nobili, L., Lombardi, L., Maiolo, A.T., Rocchi, M. and Neri, A.: Heterogeneous pattern of chromosomal breakpoints involving the MYC locus in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 37 (2003) 261-9.
- Falzetti, D., Crescenzi, B., Matteuci, C., Falini, B., Martelli, M.F., Van Den Berghe, H. and Mecucci, C.: Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. *Haematologica* 84 (1999) 298-305.
- Fenner, J.E., Starr, R., Cornish, A.L., Zhang, J.G., Metcalf, D., Schreiber, R.D., Sheehan, K., Hilton, D.J., Alexander, W.S. and Hertzog, P.J.: Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. *Nat Immunol* 7 (2006) 33-9.
- Fink, S.R., Paternoster, S.F., Smoley, S.A., Flynn, H.C., Geyer, S.M., Shanafelt, T.D., Lee, Y.K., Jelinek, D.F., Kay, N.E. and Dewald, G.W.: Fluorescent-labeled DNA probes applied to novel biological aspects of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 29 (2005) 253-62.
- Fisher, R.I.: Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol* 30 (2003) 3-9.

- Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B. and Younes, A.: Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 98 (2001) 2784-90.
- Frenzel, L., Claus, R., N, P., Schwamb, J., Konermann, C., Pallasch, C., Claasen, J., Brinker, R., Wollnik, B., Plass, C. and Wendtner, C.: Sustained NF-kappa B activity in Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is independent of genetic and epigenetic alterations in the TNFAIP3 (A29) locus. *Int J Cancer* In press. (2010).
- Frohman, M.A.: On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods Appl* 4 (1994) S40-58.
- Furman, R.R., Asgary, Z., Mascarenhas, J.O., Liou, H.C. and Schattner, E.J.: Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 164 (2000) 2200-6.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M. and Dalla-Favera, R.: p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 5413-7.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W.: Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* 16 (1997) 6131-40.
- Goossens, T., Klein, U. and Küppers, R.: Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 2463-8.
- Graf, M., Reif, S., Hecht, K., Kroell, T., Nuessler, V. and Schmetzer, H.: Expression of poliovirus receptor-related proteins PRR1 and PRR2 in acute myeloid leukemia: first report of surface marker analysis, contribution to diagnosis, prognosis and implications for future therapeutical strategies. *Eur J Haematol* 75 (2005) 477-84.
- Guo, F., Sun, A., Wang, W., He, J., Hou, J., Zhou, P. and Chen, Z.: TRAF1 is involved in the classical NF-kappaB activation and CD30-induced alternative activity in Hodgkin's lymphoma cells. *Mol Immunol* 46 (2009) 2441-8.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. and et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84 (1994) 1361-92.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S.: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132 (2008) 344-62.
- He, J.Q., Zarnegar, B., Oganessian, G., Saha, S.K., Yamazaki, S., Doyle, S.E., Dempsey, P.W. and Cheng, G.: Rescue of TRAF3-null mice by p100 NF-kappa B deficiency. *J Exp Med* 203 (2006a) 2413-8.
- He, Y., Zhang, W., Zhang, R., Zhang, H. and Min, W.: SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. *J Biol Chem* 281 (2006b) 5559-66.
- Hecht, J.L. and Aster, J.C.: Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18 (2000) 3707-21.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N. and Stein, H.: Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 4766-70.
- Herreros, B., Rodriguez-Pinilla, S.M., Pajares, R., Martinez-Gonzalez, M.A., Ramos, R., Munoz, I., Montes-Moreno, S., Lozano, M., Sanchez-Verde, L., Roncador, G., Sanchez-Beato, M., de Otazu, R.D., Perez-Guillermo, M., Mestre, M.J., Bellas, C. and Piris, M.A.: Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: the niche where NF-kappaB activation takes place. *Leukemia* 24 872-6.
- Hewamana, S., Alghazal, S., Lin, T.T., Clement, M., Jenkins, C., Guzman, M.L., Jordan, C.T., Neelakantan, S., Crooks, P.A., Burnett, A.K., Pratt, G., Fegan, C., Rowntree, C., Brennan, P. and Pepper, C.: The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 111 (2008) 4681-9.
- Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y. and Seto, M.: TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 114 (2009) 2467-75.
- Horie, R., Watanabe, T., Ito, K., Morisita, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Higashihara, M. and Kadin, M.: Cytoplasmic aggregation of TRAF2 and TRAF5 proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 160 (2002a) 1647-54.

- Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S. and Kadin, M.E.: Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 21 (2002b) 2493-503.
- Huang, J.Z., Sanger, W.G., Greiner, T.C., Staudt, L.M., Weisenburger, D.D., Pickering, D.L., Lynch, J.C., Armitage, J.O., Warnke, R.A., Alizadeh, A.A., Lossos, I.S., Levy, R. and Chan, W.C.: The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 99 (2002) 2285-90.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F., Bernd, H.W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kuhn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin-Subero, J.I., Moller, P., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Sturzenhofecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.H., Spang, R., Loeffler, M., Trumper, L., Stein, H. and Siebert, R.: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354 (2006) 2419-30.
- Ichikawa, A., Hotta, T. and Saito, H.: Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 11 (1993) 21-5.
- Iqbal, J., Greiner, T.C., Patel, K., Dave, B.J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W.G., Pickering, D.L., Jain, S., Horsman, D.E., Shen, Y., Fu, K., Weisenburger, D.D., Hans, C.P., Campo, E., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Jaffe, E.S., Delabie, J., Rimsza, L., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Vose, J.M., McKeithan, T., Staudt, L.M. and Chan, W.C.: Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 21 (2007) 2332-43.
- Iqbal, J., Sanger, W.G., Horsman, D.E., Rosenwald, A., Pickering, D.L., Dave, B., Dave, S., Xiao, L., Cao, K., Zhu, Q., Sherman, S., Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Delabie, J., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Campo, E., Lynch, J.C., Connors, J.M., Vose, J.M., Armitage, J.O., Grogan, T.M., Staudt, L.M. and Chan, W.C.: BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 165 (2004) 159-66.
- Izban, K.F., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J.Z., Martinez, R.L., Schnitzer, B., Ni, H., Nickoloff, B.J. and Alkan, S.: Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol* 14 (2001) 297-310.
- Izban, K.F., Ergin, M., Martinez, R.L. and Alkan, S.: Expression of the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) 1 and 2 is a characteristic feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol* 13 (2000) 1324-31.
- Jan, P.S., Esser, K., Pratje, E. and Michaelis, G.: Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Mol Gen Genet* 263 (2000) 483-91.
- Jiang, C., Zhao, M.L. and Diaz, M.: Activation-induced deaminase heterozygous MRL/lpr mice are delayed in the production of high-affinity pathogenic antibodies and in the development of lupus nephritis. *Immunology* 126 (2009) 102-13.
- Joos, S., Falk, M.H., Lichter, P., Haluska, F.G., Henglein, B., Lenoir, G.M. and Bornkamm, G.W.: Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Hum Mol Genet* 1 (1992) 625-32.
- Joos, S., Kupper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Moller, P., Pfreundschuh, M., Trumper, L. and Lichter, P.: Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* 60 (2000) 549-52.
- Joos, S., Menz, C.K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trumper, L., Moller, P., Lichter, P. and Barth, T.F.: Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* 99 (2002) 1381-7.
- Jundt, F., Acikgoz, O., Kwon, S.H., Schwarzer, R., Anagnostopoulos, I., Wiesner, B., Mathas, S., Hummel, M., Stein, H., Reichardt, H.M. and Dorken, B.: Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 22 (2008) 1587-94.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H. and Dorken, B.: Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99 (2002a) 3398-403.
- Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Probsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H. and Dorken, B.: Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 99 (2002b) 3060-2.

- Jung, S., Rajewsky, K. and Radbruch, A.: Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 259 (1993) 984-7.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Brauning, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. and Kuppers, R.: Clonal deleterious mutations in the *IkappaB* gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* 191 (2000) 395-402.
- Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M.L. and Rajewsky, K.: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184 (1996) 1495-505.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y. and Ogawa, S.: Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459 (2009) 712-6.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A.K., Carpten, J. and Bergsagel, P.L.: Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12 (2007) 131-44.
- Kern, C., Cornuel, J.F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.Y., Feldblum, S. and Kolb, J.P.: Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 103 (2004) 679-88.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. and Hammerschmidt, W.: Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *Embo J* 16 (1997) 6478-85.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W.: Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17 (1998) 1700-9.
- Klapproth, K. and Wirth, T.: Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol* 149 484-97.
- Klein, U. and Dalla-Favera, R.: Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 22-33.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. and Dalla-Favera, R.: Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 2639-44.
- Knuutila, S., Klefstrom, J., Szymanska, J., Lakkala, T., Peltomaki, P., Eray, M., Teerenhovi, L., Elonen, E., Franssila, K.O. and Kaartinen, M.: Two novel human B-cell lymphoma lines of lymphatic follicle origin: cytogenetic, molecular genetic and histopathological characterisation. *Eur J Haematol* 52 (1994) 65-72.
- Korbel, J.O., Urban, A.E., Affourtit, J.P., Godwin, B., Grubert, F., Simons, J.F., Kim, P.M., Palejev, D., Carriero, N.J., Du, L., Taillon, B.E., Chen, Z., Tanzer, A., Saunders, A.C., Chi, J., Yang, F., Carter, N.P., Hurles, M.E., Weissman, S.M., Harkins, T.T., Gerstein, M.B., Egholm, M. and Snyder, M.: Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 318 (2007) 420-6.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P.C., Diehl, V. and Tesch, H.: STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 98 (2001) 762-70.
- Kuo, P.C., Tsao, Y.P., Chang, H.W., Chen, P.H., Huang, C.W., Lin, S.T., Weng, Y.T., Tsai, T.C., Shieh, S.Y. and Chen, S.L.: Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor. *Cancer Res* 69 (2009) 8877-85.
- Küppers, R.: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 251-62.
- Küppers, R.: The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 9 (2009a) 15-27.
- Küppers, R.: Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2009b) 491-6.
- Küppers, R. and Dalla-Favera, R.: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20 (2001) 5580-94.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R. and Hansmann, M.L.: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 10962-6.
- Kutok, J.L. and Wang, F.: Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1 (2006) 375-404.

- Lake, A., Shield, L.A., Cordano, P., Chui, D.T., Osborne, J., Crae, S., Wilson, K.S., Tosi, S., Knight, S.J., Gesk, S., Siebert, R., Hay, R.T. and Jarrett, R.F.: Mutations of NFKBIA, encoding IkappaB alpha, are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *Int J Cancer* 125 (2009) 1334-42.
- Lam, K.P., Kuhn, R. and Rajewsky, K.: In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90 (1997) 1073-83.
- Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelet, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L. and Staudt, L.M.: Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 28-40.
- Lenoir, G.M., Vuillaume, M. and Bonnardel, C.: The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci Publ* (1985) 309-18.
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A.V., Sanger, W., Wright, G.W., Dave, S.S., Tan, B., Zhao, H., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Campo, E., Jaffe, E.S., Smeland, E.B., Fisher, R.I., Kuehl, W.M., Chan, W.C. and Staudt, L.M.: Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 204 (2007) 633-43.
- Lenz, G. and Staudt, L.M.: Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 362 (2010) 1417-29.
- Levine, E.G., Arthur, D.C., Machnicki, J., Frizzera, G., Hurd, D., Peterson, B., Gajl-Peczalska, K.J. and Bloomfield, C.D.: Four new recurring translocations in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 74 (1989) 1796-800.
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W. and Sun, S.C.: Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* 279 (2004) 26243-50.
- Lieber, M.R., Yu, K. and Raghavan, S.C.: Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 1234-45.
- Liu, Y.J., Joshua, D.E., Williams, G.T., Smith, C.A., Gordon, J. and MacLennan, I.C.: Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342 (1989) 929-31.
- Lo Coco, F., Ye, B.H., Lista, F., Corradini, P., Offit, K., Knowles, D.M., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R.: Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 83 (1994) 1757-9.
- Lopez-Guerra, M., Roue, G., Perez-Galan, P., Alonso, R., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E. and Colomer, D.: p65 activity and ZAP-70 status predict the sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to the selective IkappaB kinase inhibitor BMS-345541. *Clin Cancer Res* 15 (2009) 2767-76.
- Lossos, I.S., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Chan, W.C., Brown, P.O., Botstein, D., Staudt, L.M. and Levy, R.: Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 10209-13.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and Lieber, M.R.: Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108 (2002) 781-94.
- Maass, N., Rosel, F., Schem, C., Hitomi, J., Jonat, W. and Nagasaki, K.: Amplification of the BCAS2 gene at chromosome 1p13.3-21 in human primary breast cancer. *Cancer Lett* 185 (2002) 219-23.
- MacLennan, I.C.: Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 117-39.
- Mader, A., Bruderlein, S., Wegener, S., Melzner, I., Popov, S., Muller-Hermelink, H.K., Barth, T.F., Viardot, A. and Moller, P.: U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res* 119 (2007) 204-10.
- Maggio, E.M., Van Den Berg, A., Visser, L., Diepstra, A., Kluiver, J., Emmens, R. and Poppema, S.: Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. *Int J Cancer* 99 (2002) 665-72.
- Manis, J.P., Tian, M. and Alt, F.W.: Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 1 (2002) 31-9.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P.G., Pileri, S. and Stein, H.: Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* 337 (1997) 453-8.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. and Stein, H.: Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional

- immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 95 (2000) 1443-50.
- Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., Dyer, M.J. and Siebert, R.: Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99 (2002) 1474-7.
- Martin-Subero, J.I., Wlodarska, I., Bastard, C., Picquenot, J.M., Hoppner, J., Giefing, M., Klapper, W. and Siebert, R.: Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 108 (2006) 401-2; author reply 402-3.
- Matsushima, A., Kaisho, T., Rennert, P.D., Nakano, H., Kurosawa, K., Uchida, D., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med* 193 (2001) 631-6.
- McAvoy, S., Ganapathiraju, S.C., Ducharme-Smith, A.L., Pritchett, J.R., Kosari, F., Perez, D.S., Zhu, Y., James, C.D. and Smith, D.I.: Non-random inactivation of large common fragile site genes in different cancers. *Cytogenet Genome Res* 118 (2007) 260-9.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M. and Oettinger, M.A.: Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83 (1995) 387-95.
- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T. and Nussenzweig, M.C.: Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J Exp Med* 205 (2008) 2585-94.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. and Korsmeyer, S.J.: bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57 (1989) 79-88.
- McDonnell, T.J. and Korsmeyer, S.J.: Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349 (1991) 254-6.
- McKeithan, T.W., Takimoto, G.S., Ohno, H., Bjorling, V.S., Morgan, R., Hecht, B.K., Dube, I., Sandberg, A.A. and Rowley, J.D.: BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer* 20 (1997) 64-72.
- Melzner, I., Bucur, A.J., Bruderlein, S., Dorsch, K., Hasel, C., Barth, T.F., Leithauser, F. and Moller, P.: Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* 105 (2005) 2535-42.
- Melzner, I., Weniger, M.A., Bucur, A.J., Bruderlein, S., Dorsch, K., Hasel, C., Leithauser, F., Ritz, O., Dyer, M.J., Barth, T.F. and Moller, P.: Biallelic deletion within 16p13.13 including SOCS-1 in Karpas1106P mediastinal B-cell lymphoma line is associated with delayed degradation of JAK2 protein. *Int J Cancer* 118 (2006) 1941-4.
- Mestre, C., Rubio-Moscardo, F., Rosenwald, A., Climent, J., Dyer, M.J., Staudt, L., Pinkel, D., Siebert, R. and Martinez-Climent, J.A.: Homozygous deletion of SOCS1 in primary mediastinal B-cell lymphoma detected by CGH to BAC microarrays. *Leukemia* 19 (2005) 1082-4.
- Michaux, L., Dierlamm, J., Wlodarska, I., Bours, V., Van den Berghe, H. and Hagemeijer, A.: t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: a review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 94 (1997) 36-43.
- Motokura, T., Bloom, T., Kim, H.G., Juppner, H., Ruderman, J.V., Kronenberg, H.M. and Arnold, A.: A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350 (1991) 512-5.
- Mottok, A., Renne, C., Seifert, M., Oppermann, E., Bechstein, W., Hansmann, M.L., Kuppers, R. and Brauning, A.: Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood* 114 (2009) 4503-6.
- Mottok, A., Renne, C., Willenbrock, K., Hansmann, M.L. and Brauning, A.: Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 110 (2007) 3387-90.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T.: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102 (2000) 553-63.
- Muschen, M., Rajewsky, K., Brauning, A., Baur, A.S., Oudejans, J.J., Roers, A., Hansmann, M.L. and Kuppers, R.: Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* 191 (2000) 387-94.

- Nagasaki, K., Maass, N., Manabe, T., Hanzawa, H., Tsukada, T., Kikuchi, K. and Yamaguchi, K.: Identification of a novel gene, DAM1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 140 (1999) 219-26.
- Nagel, I., Bug, S., Tonnies, H., Ammerpohl, O., Richter, J., Vater, I., Callet-Bauchu, E., Calasanz, M.J., Martinez-Climent, J.A., Bastard, C., Salido, M., Schroers, E., Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Majid, A., Dyer, M.J. and Siebert, R.: Biallelic inactivation of TRAF3 in a subset of B-cell lymphomas with interstitial del(14)(q24.1q32.33). *Leukemia* 23 (2009) 2153-5.
- Naumovski, L., Utz, P.J., Bergstrom, S.K., Morgan, R., Molina, A., Toole, J.J., Glader, B.E., McFall, P., Weiss, L.M., Warnke, R. and et al.: SUP-HD1: a new Hodgkin's disease-derived cell line with lymphoid features produces interferon-gamma. *Blood* 74 (1989) 2733-42.
- Nesbit, C.E., Tersak, J.M. and Prochownik, E.V.: MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18 (1999) 3004-16.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. and Mann, M.: Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20 (1998) 46-50.
- Novak, U., Rinaldi, A., Kwee, I., Nandula, S.V., Rancoita, P.M., Compagno, M., Cerri, M., Rossi, D., Murty, V.V., Zucca, E., Gaidano, G., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., Bhagat, G. and Bertoni, F.: The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* 113 (2009) 4918-21.
- Nunnari, J., Fox, T.D. and Walter, P.: A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 262 (1993) 1997-2004.
- O'Shea, J.J. and Murray, P.J.: Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28 (2008) 477-87.
- Ougolkov, A.V., Bone, N.D., Fernandez-Zapico, M.E., Kay, N.E. and Billadeau, D.D.: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 110 (2007) 735-42.
- Packham, G.: The role of NF-kappaB in lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 143 (2008) 3-15.
- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S.J., Rowe, M. and Young, L.S.: Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337 (1991) 320-2.
- Papavasiliou, F.N. and Schatz, D.G.: Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408 (2000) 216-21.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., 3rd, Nussenzweig, M.C. and Dalla-Favera, R.: AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40 (2008) 108-12.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A. and Dalla-Favera, R.: Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203 (2006) 311-7.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R.: Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101 (2003) 2914-23.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K. and Dalla-Favera, R.: BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 11816-21.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R. and Dalla-Favera, R.: Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412 (2001) 341-6.
- Petek, E., Schwarzbraun, T., Noor, A., Patel, M., Nakabayashi, K., Choufani, S., Windpassinger, C., Stamenkovic, M., Robertson, M.M., Aschauer, H.N., Gurling, H.M., Kroisel, P.M., Wagner, K., Scherer, S.W. and Vincent, J.B.: Molecular and genomic studies of IMMP2L and mutation screening in autism and Tourette syndrome. *Mol Genet Genomics* 277 (2007) 71-81.
- Petek, E., Windpassinger, C., Vincent, J.B., Cheung, J., Boright, A.P., Scherer, S.W., Kroisel, P.M. and Wagner, K.: Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. *Am J Hum Genet* 68 (2001) 848-58.
- Phan, R.T. and Dalla-Favera, R.: The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432 (2004) 635-9.
- Pickering, B.M., de Mel, S., Lee, M., Howell, M., Habens, F., Dallman, C.L., Neville, L.A., Potter, K.N., Mann, J., Mann, D.A., Johnson, P.W., Stevenson, F.K. and Packham, G.: Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 26 (2007) 1166-77.

- Poppema, S., De Jong, B., Atmosoerodjo, J., Idenburg, V., Visser, L. and De Ley, L.: Morphologic, immunologic, enzyme histochemical and chromosomal analysis of a cell line derived from Hodgkin's disease. Evidence for a B-cell origin of Sternberg-Reed cells. *Cancer* 55 (1985) 683-90.
- Pospisilova, H., Baens, M., Michaux, L., Stul, M., Van Hummelen, P., Van Loo, P., Vermeesch, J., Jarosova, M., Zemanova, Z., Michalova, K., Van den Berghe, I., Alexander, H.D., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., Cools, J., De Wolf-Peeters, C., Marynen, P. and Wlodarska, I.: Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia* 21 (2007) 2079-83.
- Pulvertaft, J.V.: Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 1 (1964) 238-40.
- Qi, C., Zhu, Y.T., Chang, J., Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and Zhu, Y.J.: Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2. *Biochem Biophys Res Commun* 328 (2005) 393-8.
- Qing, Y., Costa-Pereira, A.P., Watling, D. and Stark, G.R.: Role of tyrosine 441 of interferon-gamma receptor subunit 1 in SOCS-1-mediated attenuation of STAT1 activation. *J Biol Chem* 280 (2005) 1849-53.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. and MacDonald, H.R.: Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5 (2004) 247-53.
- Rajewsky, K.: Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381 (1996) 751-8.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C.: AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118 (2004) 431-8.
- Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M. and Nussenzweig, M.C.: Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol* 4 (2003) 452-6.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lapelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. and Durandy, A.: Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102 (2000) 565-75.
- Rimokh, R., Rouault, J.P., Wahbi, K., Gadoux, M., Lafage, M., Archimbaud, E., Charrin, C., Gentilhomme, O., Germain, D., Samarut, J. and et al.: A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 3 (1991) 24-36.
- Robinson, H.M., Taylor, K.E., Jalali, G.R., Cheung, K.L., Harrison, C.J. and Moorman, A.V.: t(14;19)(q32;q13): a recurrent translocation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 39 (2004) 88-92.
- Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., Tabilio, A., Di Ianni, M., Fettucciari, K., Bartoli, A., Coaccioli, S., Screpanti, I. and Marconi, P.: Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 113 (2009) 856-65.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J.C., Grever, M.R., Cheson, B.D., Chiorazzi, N., Wilson, W.H., Kipps, T.J., Brown, P.O. and Staudt, L.M.: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 194 (2001) 1639-47.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltnane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T. and Staudt, L.M.: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 (2002) 1937-47.
- Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Campo, E., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Braziel, R., Grogan, T.M., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Chiorazzi, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D. and Staudt, L.M.: Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198 (2003) 851-62.

- Ruan, Y., Ooi, H.S., Choo, S.W., Chiu, K.P., Zhao, X.D., Srinivasan, K.G., Yao, F., Choo, C.Y., Liu, J., Ariyaratne, P., Bin, W.G., Kuznetsov, V.A., Shahab, A., Sung, W.K., Bourque, G., Palanisamy, N. and Wei, C.L.: Fusion transcripts and transcribed retrotransposed loci discovered through comprehensive transcriptome analysis using Paired-End diTags (PETs). *Genome Res* 17 (2007) 828-38.
- Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S. and Lu, K.P.: Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12 (2003) 1413-26.
- Savage, K.J., Monti, S., Kutok, J.L., Cattoretti, G., Neuberger, D., De Leval, L., Kurtin, P., Dal Cin, P., Ladd, C., Feuerhake, F., Aguiar, R.C., Li, S., Salles, G., Berger, F., Jing, W., Pinkus, G.S., Habermann, T., Dalla-Favera, R., Harris, N.L., Aster, J.C., Golub, T.R. and Shipp, M.A.: The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102 (2003) 3871-9.
- Schmidt, A., Schmitz, R., Giefing, M., Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Vater, I., Massow, A., Maggio, E., Schneider, M., Hansmann, M.L., Siebert, R. and Kuppers, R.: Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49 803-9.
- Schmitz, R., Hansmann, M.L., Bohle, V., Martin-Subero, J.I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R. and Küppers, R.: TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 206 (2009a) 981-9.
- Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M.L. and Küppers, R.: Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol* 4 (2009b) 151-74.
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G. and Schatz, G.: Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *Embo J* 10 (1991) 247-54.
- Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mochegova, S.N., Woodland, R.T. and Stavenezer, J.: Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med* 202 (2005) 561-6.
- Schroeder, H.W., Jr. and Dighiero, G.: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 15 (1994) 288-94.
- Schwaenen, C., Nessling, M., Wessendorf, S., Salvi, T., Wrobel, G., Radlwimmer, B., Kestler, H.A., Haslinger, C., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Bentz, M. and Lichter, P.: Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 1039-44.
- Schwering, I., Brauninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K. and Küppers, R.: Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101 (2003) 1505-12.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C. and Stein, H.: Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* 95 (2000) 3020-4.
- Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X. and Storb, U.: Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280 (1998) 1750-2.
- Skinninger, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U. and Mak, T.W.: Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 99 (2002) 618-26.
- Stamatopoulos, K., Kosmas, C., Belessi, C., Kyriazopoulos, P., Papadaki, T., Anagnostou, D. and Loukopoulos, D.: Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol* 105 (1999) 190-7.
- Steidl, C., Telenius, A., Shah, S.P., Farinha, P., Barclay, L., Boyle, M., Connors, J.M., Horsman, D.E. and Gascoyne, R.D.: Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood* 116 418-27.
- Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Benner, A., Wildenberger, K., Bentz, M., Dohner, K., Ho, A.D., Lichter, P. and Dohner, H.: Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 13 (1999) 1331-4.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L. and Cory, S.: Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348 (1990) 331-3.
- Strasser, A., Harris, A.W. and Cory, S.: E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 8 (1993) 1-9.

- Takizawa, M., Tolarova, H., Li, Z., Dubois, W., Lim, S., Callen, E., Franco, S., Mosaico, M., Feigenbaum, L., Alt, F.W., Nussenzweig, A., Potter, M. and Casellas, R.: AID expression levels determine the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *J Exp Med* 205 (2008) 1949-57.
- Tashiro, J., Kinoshita, K. and Honjo, T.: Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int Immunol* 13 (2001) 495-505.
- The-Non-Hodgkin's-Lymphoma-Classification-Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89 (1997) 3909-18.
- Tsujimoto, Y., Louie, E., Bashir, M.M. and Croce, C.M.: The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene* 2 (1988) 347-51.
- Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J.M.: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 (1988) 440-2.
- Wagner, S.D. and Neuberger, M.S.: Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 14 (1996) 441-57.
- Wang, C.L., Harper, R.A. and Wabl, M.: Genome-wide somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 7352-6.
- Warner, M.S., Geraghty, R.J., Martinez, W.M., Montgomery, R.I., Whitbeck, J.C., Xu, R., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. and Spear, P.G.: A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HvE) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246 (1998) 179-89.
- Weber-Matthiesen, K., Deerberg, J., Poetsch, M., Grote, W. and Schlegelberger, B.: Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood* 86 (1995) 1464-8.
- Weiss, L.M., Warnke, R. and Hansmann, M.L.: Pathology of Hodgkin Lymphoma. In: Mauch, P.M., Diehl, V., Hoppe, R.T. and Weiss, L.M. (Eds.), *Hodgkin Lymphoma*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp. 43-71.
- Weniger, M.A., Gesk, S., Ehrlich, S., Martin-Subero, J.I., Dyer, M.J., Siebert, R., Moller, P. and Barth, T.F.: Gains of REL in primary mediastinal B-cell lymphoma coincide with nuclear accumulation of REL protein. *Genes Chromosomes Cancer* 46 (2007) 406-15.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., Wegener, S., Bucur, A.J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.F. and Moller, P.: Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 25 (2006) 2679-84.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V. and Dixit, V.M.: De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430 (2004) 694-9.
- Willis, T.G. and Dyer, M.J.: The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96 (2000) 808-22.
- Wolf, J., Kapp, U., Bohlen, H., Kornacker, M., Schoch, C., Stahl, B., Mucke, S., von Kalle, C., Fonatsch, C., Schaefer, H.E., Hansmann, M.L. and Diehl, V.: Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 87 (1996) 3418-28.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E.H., Wiestner, A. and Staudt, L.M.: A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 9991-6.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M. and Ashwell, J.D.: Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 8 (2006) 398-406.
- Wuerffel, R.A., Du, J., Thompson, R.J. and Kenter, A.L.: Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol* 159 (1997) 4139-44.
- Yang, E. and Korsmeyer, S.J.: Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88 (1996) 386-401.
- Ye, B.H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R.: Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262 (1993) 747-50.
- Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C.D., White, J.M., Goeddel, D.V. and Schreiber, R.D.: Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 291 (2001) 2162-5.

- Yoshida, S., Nakazawa, N., Iida, S., Hayami, Y., Sato, S., Wakita, A., Shimizu, S., Taniwaki, M. and Ueda, R.: Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma. *Leukemia* 13 (1999) 1812-6.
- Yu, K., Roy, D., Bayramyan, M., Haworth, I.S. and Lieber, M.R.: Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 1730-6.
- Zarnegar, B., Yamazaki, S., He, J.Q. and Cheng, G.: Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 3503-8.
- Zeidler, R., Joos, S., Delecluse, H.J., Klobeck, G., Vuillaume, M., Lenoir, G.M., Bornkamm, G.W. and Lipp, M.: Breakpoints of Burkitt's lymphoma t(8;22) translocations map within a distance of 300 kb downstream of MYC. *Genes Chromosomes Cancer* 9 (1994) 282-7.
- Zenz, T., Mertens, D., Kuppers, R., Dohner, H. and Stilgenbauer, S.: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10 37-50.
- Zhang, J., Bottaro, A., Li, S., Stewart, V. and Alt, F.W.: A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *Embo J* 12 (1993) 3529-37.

Teilpublikation

Philipp C, Edelmann J, Bühler A, Winkler D, Stilgenbauer S, Küppers R.

Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL.

Int J Cancer. 2010 Jun 7. [Im Druck]

Eingereichte Manuskripte

Itziar Salaverria, Ph.D.* , Claudia Philipp, Ph.D.* , Ilske Oeschles, M.D.* , Christian W Kohler*, Markus Kreuz*, Monika Szczepanowski, Ph.D., Birgit Burkhardt, M.D., Heiko Trautmann, Ph.D., Stefan Gesk, M.D., Mirosław Andrusiewicz, Ph.D., Hilmar Berger, M.D., Miriam Fey, Lana Harder, M.D., Dirk Hasenclever, Michael Hummel, Ph.D., Markus Loeffler, M.D., Friederike Mahn, M.D., Idoia Martin-Guerrero, Ph.D., Christiane Pott, M.D., Michael Pfreundschuh, M.D., Alfred Reiter, M.D., Julia Richter, M.S., Maciej Rosolowski, Ph.D., Carsten Schwaenen, M.D., Harald Stein, M.D., Lorenz Trümper, M.D., Swen Wessendorf, M.D., Rainer Spang, Ph.D., Ralf Küppers, Ph.D., Wolfram Klapper, M.D., Reiner Siebert, M.D.

Recurrent Immunoglobulin Gene Translocations Activating the *IRF4* Oncogene Identify a Novel Genetic Subtype of Germinal-center Derived B-cell Lymphoma Affecting Predominantly Children and Young Adults.

* Diese Autoren teilen eine gemeinsame Koerstautorenschaft

Heiko Trautmann, Anastasia Hadzidimitriou, Nikos Darzentas, Monika Szczepanowski, Hilmar Berger, Claudia Philipp, Stefan Bentink, Birgit Burkhardt, Michael Hummel, Markus Loeffler, Alfred Reiter, Rainer Spang, Harald Stein, Lorenz Trümper, Michael Kneba, Reiner Siebert, Wolfram Klapper, Ralf Küppers, Kostas Stamatopoulos, Christiane Pott

Evidence for antigen driven development of sporadic Burkitt Lymphomas.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht natürlich zuerst an Prof. Dr. Ralf Küppers für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank für eure Hilfsbereitschaft und vielfältige Unterstützung: Philip Abstoß, Gwen Lorenz, Kerstin Heise, Julia Jesdinsky-Elsenbruch und Andrea Kopplin.

Danken möchte ich auch unseren Kooperationsgruppen in den Pathologien in der Universitätsklinik Frankfurt (M) und des Universitätsklinikum Münster für eine tolle Zusammenarbeit und wertvolle Diskussionen. Ganz besonders möchte ich mich dabei bei Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann und Prof. Dr. Andreas Bräuninger bedanken.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Reiner Siebert und seiner Arbeitsgruppe in der Humanen Genetik im Universitätsklinikum Kiel für die vielen Diskussionen, die tolle Zusammenarbeit und die Durchführung der FISH-Analysen.

Und meiner gesamten Arbeitsgruppe: Vielen lieben Dank für die tolle Zeit.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationsgruppen erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an den entsprechenden Stellen hingewiesen.